PLANTA

ARCHIV
FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

E. BÜNNING-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

46. BAND, 1. HEFT

MIT 51 TEXTABBILDUNGEN, IN 69 EINZELDARSTELLUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 3. SEPTEMBER 1955)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1955

Planta (Berl.)

Preis DM 24.60

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik.

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä., von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

---

46. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 1. Heft

Seite

Mühlethaler, K., Die Struktur einiger Pollenmembranen. Mit 6 Textabbildungen, in 24 Einzeldarstellungen 1

Barthelmess, A., Über die Analyse von Scheitelmustern. Mit 1 Textabbildung 14

Ruckenbrod, H., Untersuchungen über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen. Mit 7 Textabbildungen 19

Kandler, O., und H. Ernst, Über den Einfluß organischer Säuren auf die Atmung, den Ammoniumeinbau und den Gehalt an freien Aminosäuren von Chlorella. Mit 20 Textabbildungen 46

Döpp, W., Experimentell erzeugte Bastarde zwischen *Dryopteris Filix-mas* (L.) Schott und *D. paleacea* (Sw.) C. Chr. Mit 14 Textabbildungen . . . 70

Drumm, K., Vergleichende Untersuchung über Etiolement und Pigmentgehalt an chlorophylldefekten und normalen Sprossen von *Tradescantia albiflora* var. *albovittata*. Mit 3 Textabbildungen 92

Planta, Bd. 46, S. 1—13 (1955).

Aus dem Institut für Allgemeine Botanik der E. T. H. Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Zürich.

DIE STRUKTUR EINIGER POLLENMEMBRANEN.

Von

K. MÜHLETHALER.

Mit 6 Textabbildungen, in 24 Einzeldarstellungen.

(Eingegangen am 28. Februar 1955.)

Einleitung.

Die genaue Kenntnis der Sporodermstruktur bildet die Grundlage für viele Probleme der Taxonomie und für die Abklärung der nacheiszeitlichen Florengeschichte durch die Pollenanalyse. Mit dem Lichtmikroskop können in vielen Fällen die feinen Strukturen der Exine nicht mehr genau bestimmt werden. Es war daher naheliegend, für solche Untersuchungen das Elektronenmikroskop zu verwenden und dafür entsprechende Präparationsmethoden auszuarbeiten. Die Dünnschnittmethode mit Hilfe der Methacrylateinbettung ermöglicht es, das sehr harte Sporoderm im Schnitt zu studieren, und verschiedene Arbeiten sind darüber von FERNÁNDEZ-MORÁN und DAHL (1952), MÜHLETHALER (1953) und AFZELIUS, ERDTMAN und SJÖSTRAND (1954) bereits erschienen. Sie zeigten, daß anhand der Schnittbilder die Stratifikation für zahlreiche Pollenmembranen eindeutig festgelegt werden kann. Um aber ein lückenloses Gesamtbild einer solchen Wand zu erhalten, ist auch die Abbildung der Oberflächenskulptur notwendig. Ein einfaches Abdruckverfahren muß daher als Ergänzung zur Schnittmethode herangezogen werden. Versuche in dieser Richtung veröffentlichte SITTE (1953), der dafür das Kollodiumabdruckverfahren nach MAHL (1940) verwendete. Nach unseren Erfahrungen lassen sich aber stark zerklüftete Oberflächen, wie sie bei vielen Pollenkörnern zu finden sind, mit dieser Methode nicht immer befriedigend abbilden. Das gelöste Kollodium dringt durch die zahlreichen Poren in die Hohlräume des Sporoderms ein und nach dem Eintrocknen ist ein Ablösen des Filmes in den meisten Fällen nicht mehr möglich. KÖNIG und HELWIG (1951) zeigten, daß für poröse Oberflächen das von ihnen entwickelte Kohlehautverfahren allen anderen Abdruckmethoden überlegen ist. HELMCKE und KRIEGER (1951) haben diese Technik mit großem Erfolg zur Untersuchung von Diatomeenschalen verwendet und es lag daher nahe, sie auch bei den ähnlich gebauten Pollenkörnern zu verwenden. Wie die

hier reproduzierten Aufnahmen (Abb. 2—6) zeigen, können die Oberflächen der Pollenkörner mit diesem Verfahren naturgetreu im Elektronenmikroskop abgebildet werden.

Methode.

Die zu untersuchenden Pollenkörner wurden zuerst in abs. Alkohol suspendiert, dann auf einem Glasobjektträger gleichmäßig verteilt und angetrocknet. Auf dieses Präparat dampften wir im Vakuum eine dünne Kohleschicht auf und lösten diese dann mit den Pollenkörnern vom Glas ab. Da eine mechanische Trennung des Pollens von der ihn überziehenden Kohlehaut nicht möglich ist, muß er chemisch weggelöst werden. Die Membranen, die gegenüber den meisten organischen Lösungsmitteln und anorganischen Säuren sehr resistent sind, lösten wir in 40% Chromsäure auf. In 2—3 Std sind die Pollenkörner vollständig abgebaut, und die auf der Oberfläche der Säure schwimmende Kohlehaut wird dann in dest. Wasser übertragen. Nach mehrmaligem Waschen zerschnitten wir die Kohlehaut in kleine Stücke und zogen diese auf Objektträgernetzchen auf.

Einige zum Gelingen der Methode wichtige Präparationsschritte, wie z. B. das Ablösen der bedampften Pollenkörner vom Objektträger und die Kohleaufdampfung, sollen im folgenden noch etwas ausführlicher beschrieben werden. Vom unbehandelten Glasplättchen lassen sich die Kohlehäute durch Eintauchen in Wasser nicht ablösen und es erwies sich daher als notwendig, diese vor dem Antrocknen des Pollens mit einer dünnen Formvarschicht zu überziehen. Im Laufe der Untersuchung ergab sich, daß an Stelle dieser Folie auch eine dünne Schicht eines synthetischen Reinigungsmittels, z. B. Teepol verwendet werden kann. Dieses wird als etwa 10% Lösung auf dem Objektträger aufgetragen und getrocknet. Die Pollenkörner liegen somit auf einem hydrophilen Film, der nach dem Bedampfen durch Eintauchen in Wasser in wenigen Sekunden weggelöst wird.

Zur Herstellung der Kohlehäute verwendeten wir nicht das von KÖNIG und HELWIG (1951) beschriebene Verfahren durch Glimmentladung in einer Benzolatmosphäre, sondern die von BRADLEY (1954) ausgearbeitete Aufdampfmethode. ROBERT, BUSSOT und BUZON (1953) haben ebenfalls eine solche Technik beschrieben. Zwei Kohlenstäbe von etwa 0,5 cm Durchmesser, wie sie für kleinere Bogenlampen Verwendung finden, werden in je ein Quarzröhrchen von etwa 8 cm Länge gesteckt und an den Elektroden der Aufdampfvorrichtung befestigt. Sie müssen sich mit ihren Spitzen leicht berühren und auch während des Aufdampfprozesses immer in Kontakt bleiben. Um das zu erreichen, bleibt der eine Kohlenstab festgeklemmt, während der andere durch eine Feder dauernd nachgeschoben wird. Beim Durchgang einer Wechselspannung

mit 20—40 Amp. erhitzt sich die Berührungsstelle bis zum Verdampfungspunkt der Kohle, und nach einigen Sekunden ist das Präparat mit einer feinen Schicht überzogen. Diese ist an den gegen die Verdampfungsquelle gerichteten Flächen dicker als in den „Schattenpartien", was im Elektronenmikroskop sehr plastische Bilder ergibt. Die Tatsache, daß auch die der Verdampfungsquelle abgelegene Seite mit einer feinen Kohlenschicht überzogen ist, muß wohl durch Reflexion der auftreffenden C-Atome erklärt werden.

Die Terminologie des Sporoderms.

In den botanischen Lehrbüchern wird in der Pollenwand gewöhnlich nur zwischen der Exine und der Intine unterschieden. Auf Grund von genauen mikroskopischen Beobachtungen ist es aber den Pollenanalytikern gelungen, eine feinere Unterteilung vorzunehmen. Die Terminologie dieser Schichten ist recht kompliziert geworden, weil für das gleiche Bauelement oft mehrere synonyme Bezeichnungen existieren. So wird die Exine nach der klassischen Terminologie in Ectexine und Endexine unterteilt, während Erdtman (1952) dafür die Ausdrücke Sexine (Abkürzung für *s*kulpturierte *Exine*) und Nexine (*n*ichtskulpturierte *Exine*) geprägt hat. Seine Unterteilung geht noch weiter, indem er die äußere Schicht der Sexine als Ecto-, die innere als Endosexine bezeichnet. Analog unterteilt er auch die Nexine. Die Terminologie nach Erdtman (1952) ist sehr logisch aufgebaut und hat gegenüber der klassischen den Vorzug, daß viele, genau definierte Detailbezeichnungen neu geprägt wurden. Wie unsere Untersuchungen zeigen, können damit auch die feinsten im Elektronenmikroskop sichtbaren Strukturen noch gut beschrieben werden. Aus diesem Grunde haben wir uns bemüht, diese Terminologie zu verwenden.

Die wichtigsten Elemente des Sporoderms und ihre Bezeichnungen sind in der Textabbildung zusammengestellt worden. Für ein eingehendes Studium sei nochmals auf die Monographien von Erdtman (1952, 1954) oder die Arbeit von Faegri und Iversen (1950) verwiesen.

Trotz der großen Formenmannigfaltigkeit läßt sich für die Pollenwand eine, allerdings nur hypothetische Grundform ableiten, die alle Elemente des Sporoderms enthält. Es ist dies die pilate Sexine, die aus einer Basalschicht der Nexine besteht, aus der keulenförmige Stäbchen, die Pila, radial herauswachsen (s. Abb. 1). Letztere gliedern sich in einen Kopfteil (Caput), der zur Ectosexine gehört, und einen unteren Abschnitt, das Säulchen (Baculum, syn. Columella), welches der Endosexine entspricht. Durch Verschmelzen der Capita oder der Bacula nach einer oder mehreren Richtungen kann eine striate, reticulate oder tegil-

late Sexine entstehen, wie das aus der Skizze ersichtlich ist. Bei zahlreichen Pollensorten können auf der Oberfläche noch zusätzliche Skulpturen, wie z. B. Stacheln (spinae), feine Stacheln (spinulae) oder Warzen (verrucae) vorhanden sein, die entweder der Ectosexine oder einer darüber liegenden Schicht, der Perine, angehören. Die Dicke der Sexine, Nexine und Intine kann bei verschiedenen Membranen stark variieren.

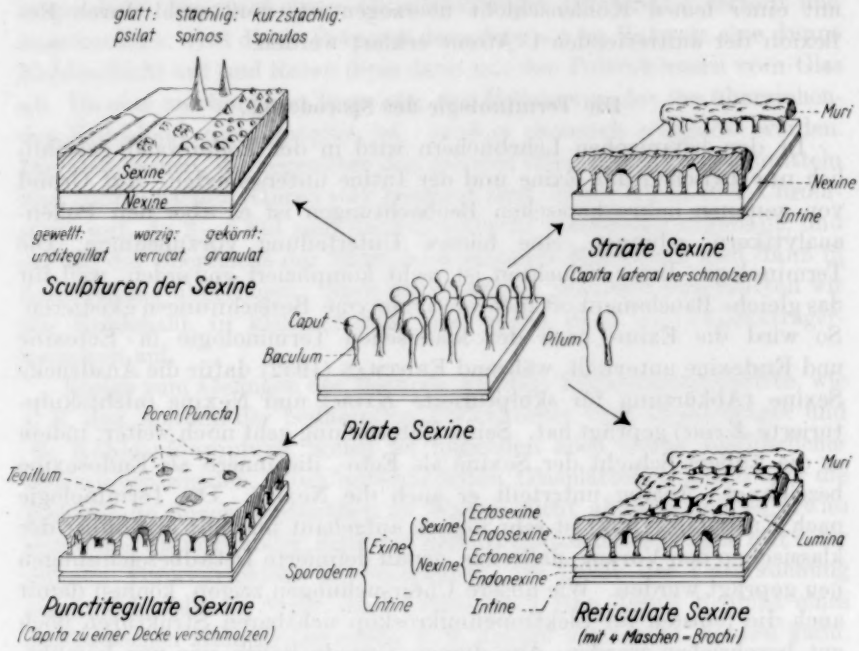


Abb. 1. Strukturen der Sexine. Terminologie nach G. ERDTMAN.

Ist die Nexine z. B. doppelt so dick wie die Sexine, so bezeichnet ERDTMAN (1952) eine solche Exine als crassinexinat oder tenuisexinat. Ist das Dickenverhältnis umgekehrt, so spricht er von einer crassisexinaten oder tenuinexinaten Exine. In gleicher Weise wird die Ectosexine als crassitegillat oder tenuitegillat bezeichnet, je nachdem das Tegillum doppelt oder halb so dick ist wie die darunter liegenden Elemente der Endosexine.

Ergebnisse.

Pinus nigra (Schwarzföhre), Fam. Pinaceen.

Einige typische Oberflächen- und Schnittbilder von diesem Pollen sind in Abb. 2, Aufnahmen 1—4 wiedergegeben. Die dorsale Seite ist von einer derben, etwa 1,4 μ dicken Exine bedeckt, deren Oberfläche durch unregelmäßig geformte, knollenförmige Erhebungen, die selbst wieder mit feinen Körnchen besetzt sind, bestimmt wird (Fig. 1). Auf

diese tegillate Ectosexine folgt eine Schicht mit unregelmäßig geformten Bacula, die in der etwa 0,15 μ dicken Nexine verankert sind. Die Intine erscheint im Schnitt als strukturlose Schicht von gleicher Dicke wie die Exine (Fig. 3). Die verschiedenartige stoffliche Zusammensetzung der beiden Schichten äußert sich auch im verschiedenen Streuvermögen gegenüber den Elektronen. Sehr kontrastreich erscheint die Exine, die aus Sporopollenin besteht, während die pektinhaltige Intine nur wenig streut. Da genaue chemische Analysen der Pollenmembran immer noch fehlen, weiß man nichts Genaues über die Natur der Sporopollenine. Im Elektronenmikroskop erscheinen diese Substanzen amorph. Untersuchungen von SITTE (1953) an stark abgebauten Membranen ergaben, daß in der Intine von *Pinus silvestris* ein Fibrillengeflecht aus Cellulose vorhanden ist, wie wir es früher für Primärwände beschrieben haben (FREY-WYSSLING, MÜHLETHALER und WYCKOFF 1948; MÜHLETHALER 1950). Bei unbehandelten Pollenkörnern, wie wir sie für unsere Schnitte verwendeten, ist dieses Geflecht der Intine nicht sichtbar, weil es durch inkrustierte Zellwandstoffe völlig verdeckt wird. Ob auch in der Exine ein Cellulosegerüst vorhanden ist, konnten wir anhand unserer Aufnahmen nicht entscheiden.

Auf der ventralen Seite befinden sich die beiden für diesen Flugpollen typischen Luftsäcke. Diese besitzen unter der dünnwandigen Membran ein lockeres Gerüst, das nach WODEHOUSE (1935) als Verstärkungssystem anzusehen ist und ein Zusammenfallen der Säcke verhindern soll. Im zentralen Teil sind diese sacci leer. Nach der Terminologie der Sporodermstratifikation gehört die Sackmembran zur Ectosexine, während die darunter befindliche Verstärkungsschicht als Differenzierung der Endosexine anzusehen ist. In ihrem Aufbau entspricht also diese Membran der tegillat-baculaten Sexine der dorsalen Seite, nur daß sie im Bereich der Luftsäcke von der Nexine abgelöst ist. Solche subsaccate Pollenkörner kommen außer bei Koniferen auch in zahlreichen anderen Familien vor.

Fagus silvatica (Rotbuche), Fam. Fagaceen.

Zwei Oberflächenansichten und ein Schnitt durch das Sporoderm sind in Abb. 3, Fig. 5—7, wiedergegeben. Im Lichtmikroskop ist eine genaue Bestimmung der Oberflächenskulptur nicht möglich. Die Abdrucke ergaben, daß die Oberfläche mit Ausnahme der Keimporen mit feinen Dornen besetzt ist, die sehr eng nebeneinander stehen. ERDTMAN (1952) vermutete, daß es sich bei diesen spinuloiden Körpern um die verlängerten, zugespitzten Pila-Enden handelt, die über das Tegillum herausragen. Dünnschnitte durch die Exine (Fig. 6) zeigen jedoch, daß ein solcher Zusammenhang zwischen den Stacheln und den darunter liegenden Bacula nicht besteht. Es sind nur lokal verdickte Stellen des

Tegillums. Die Dicke der Exine beträgt im Mittel 0,6 μ. Die Nexine weist mit 0,3 μ ungefähr die gleiche Dicke auf wie die Ectosexine.

Quercus robur (Stieleiche), Fam. Fagaceen.

Die Pollenoberfläche ist dicht mit Warzen verschiedener Größe übersät (Abb. 3, Fig. 8), die zum Teil auch im Lichtmikroskop erkennbar sind. Die kleinsten Körnchen weisen einen Durchmesser von etwa 50 mμ auf. Wie bei dem oben besprochenen *Fagus*pollen handelt es sich bei diesen Gebilden um lokal stark verdickte Stellen des Tegillums (Fig. 9). Die Membran entspricht im übrigen einer tegillat-baculaten Exine, wie sie bereits oben besprochen wurde.

Alnus rotundifolia (Schwarzerle), Fam. Betulaceen.

Die 19—27 μ großen Pollenkörner haben 4—5 Aperturen, die untereinander durch bogenförmige Verdickungswülste (Arcus) verbunden sind. Diese Struktur findet man sonst bei keinem anderen Pollen der Betulaceen. Die Oberfläche ist mit feinen Stacheln besetzt, die eine Länge von etwa 0,1 μ aufweisen (Fig. 10—12). Die elliptischen Keimporen weisen ein stark variables Achsenverhältnis auf, wie das aus den Fig. 10 und 11 ersichtlich ist. Die Sexine ist doppelt so dick wie die Nexine. Sie ist also crassisexinat und gleichzeitig crassitegillat, da die Ectosexine dicker ist als die oft kaum erkennbare baculate Endosexine. Wie aus dem Schnittbild in Fig. 12 hervorgeht, ist an den Arcus nicht nur die Sexine, sondern auch die Nexine verdickt.

Corylus avellana (Haselnuß), Fam. Betulaceen.

Licht- und elektronenmikroskopisch weisen diese Pollenkörner genau die gleiche Oberflächenskulptur auf, wie der oben erwähnte *Alnus*-Pollen (Abb. 4, Fig. 13—15). Die Aperturen sind rund bis schwach elliptisch mit einem Durchmesser von etwa 2 μ (Fig. 15). Die Exine ist ebenfalls crassisexinat-crassitegillat wie bei *Alnus*. JENTYS-SZAFER (1928) untersuchte *Corylus*-Pollen, der vorher mit Schwefelsäure, verdünnter Chromsäure oder Kalilauge gequollen wurde. Nach dieser Behandlung erkannte er im Lichtmikroskop fünf verschiedene Schichten in der Exine und zwar zwei dickere und drei dünnere. In unseren Dünnschnitten (Fig. 13) sind aber nur die tegillat-baculate Sexine und die Nexine zu beobachten. Die Aufblätterung in mehrere Schichten muß durch die Quellung erfolgt sein und deutet darauf hin, daß die dicke Ectosexine aus konzentrischen Lamellen aufgebaut ist. Bei ungequollenen Membranen, wie wir sie untersuchten, liegen die Schichten eng gepackt aufeinander und können daher nicht voneinander unterschieden werden. Diese Erklärung wird durch die Untersuchungen von

Afzelius, Erdtman und Sjöstrand (1954) gestützt, die in der Sporenwand von *Lycopodium clavatum* und in der Pollenwand von Coniferen eine Schichtenstruktur fanden, die aus Elementarlamellen von 130 Å Dicke aufgebaut ist. Wieweit diese Lamellenstruktur der Exine auch für andere Pollenformen gilt, bleibt noch abzuklären.

Petunia hybrida grandiflora, Fam. Solanaceen.

Alle bis jetzt beschriebenen Pollenmembranen besaßen eine tegillate Sexine, die mit mannigfaltigen skulpturellen Elementen wie Warzen *(Quercus)*, Granula *(Pinus)* oder Stacheln *(Alnus* und *Corylus)* besetzt waren. Wie die Oberflächenabdrucke in Abb. 5, Fig. 16 und 17 zeigen, weist *Petunia* eine reticulate Sexine auf. Die Lumina sind rund bis schwach elliptisch und variieren in ihrem Durchmesser zwischen 0,5—1 μ. Sowohl die Muri wie die Lumina sind glatt.

Aeschynanthus lobbianus, Fam. Gesneriaceen.

Wie der von *Petunia* weist auch dieser Pollen eine reticulate Sexine auf, wobei aber die Lumina ganz unregelmäßige Form besitzen. Aus dem Schnittbild (Abb. 5, Fig. 20) allein könnte man diese Oberflächenform nicht ohne weiteres ableiten. Im übrigen weist dieses Sporoderm die gleiche Stratifikation auf, wie sie bereits beschrieben wurde. Die Ectosexine ist nur auf den Muri als dünnes Häutchen vorhanden.

Cucurbita pepo (Kürbis), Fam. Cucurbitaceen.

Die bis 180 μ großen Pollenkörner der *Cucurbita*-Arten sind wohl jedem Botaniker wegen ihrer stachelbesetzten Oberfläche und der Deckel, welche über die Keimporen gestülpt sind, aus den Mikroskopierkursen her bekannt. Einige Stacheln messen bis zu 8 μ, aber dazwischen sind noch zahlreiche kleinere von nur 1—2 μ Länge vorhanden (Abb. 6, Fig. 21—23). Wie die Schnitte in Fig. 22 zeigen, finden wir in diesen Skulpturen keine interne Struktur. Sie sind aus einer amorphen Substanz aufgebaut, die aus der Ectosexine herauswächst und die wohl aus Sporopollenin besteht. Eine Unterteilung des Sporoderms in die verschiedenen Schichten ist recht schwierig, da die baculate Endosexine fehlt, welche die Ectosexine von der Nexine trennt. An den runden Aperturen ist die Intine papillenartig vorgewölbt, wodurch die Deckel von der Oberfläche abgehoben werden. Letztere haben den gleichen Aufbau wie die angrenzende Exine und tragen wie diese Stacheln.

Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyssling, dem Vorsteher unseres Institutes, möchte ich für die wertvollen Anregungen und seine stete Hilfsbereitschaft meinen besten Dank aussprechen, dem Verlag und den Herausgebern für die Ausstattung, dem Herausgeber, Herrn Prof. Renner, für Rat in der Fassung verschiedener Termini.

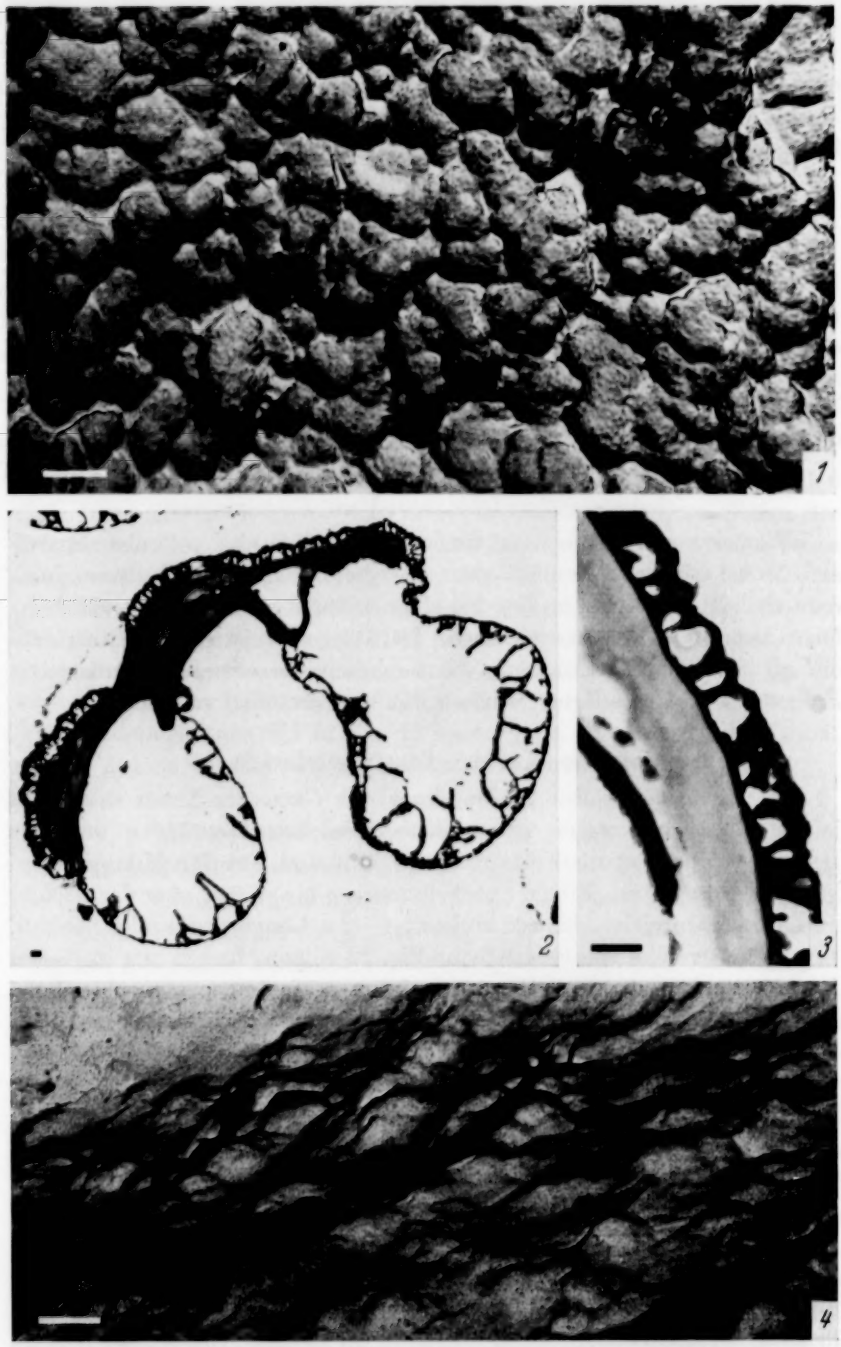


Abb. 2. Fig. 1. Pollenoberfläche von Pinus nigra. Vergr. 8600 ×. Fig. 2. Pollenkorn im Schnitt, mit den beiden Luftsäcken. Vergr. 1300 ×. Fig. 3. Dünnschnitt durch das Sporoderm. Vergr. 6300 ×. Fig. 4. Die Randpartie eines Abdruckes zeigt die Oberfläche in schiefer Aufsicht. Vergr. 8400 ×.

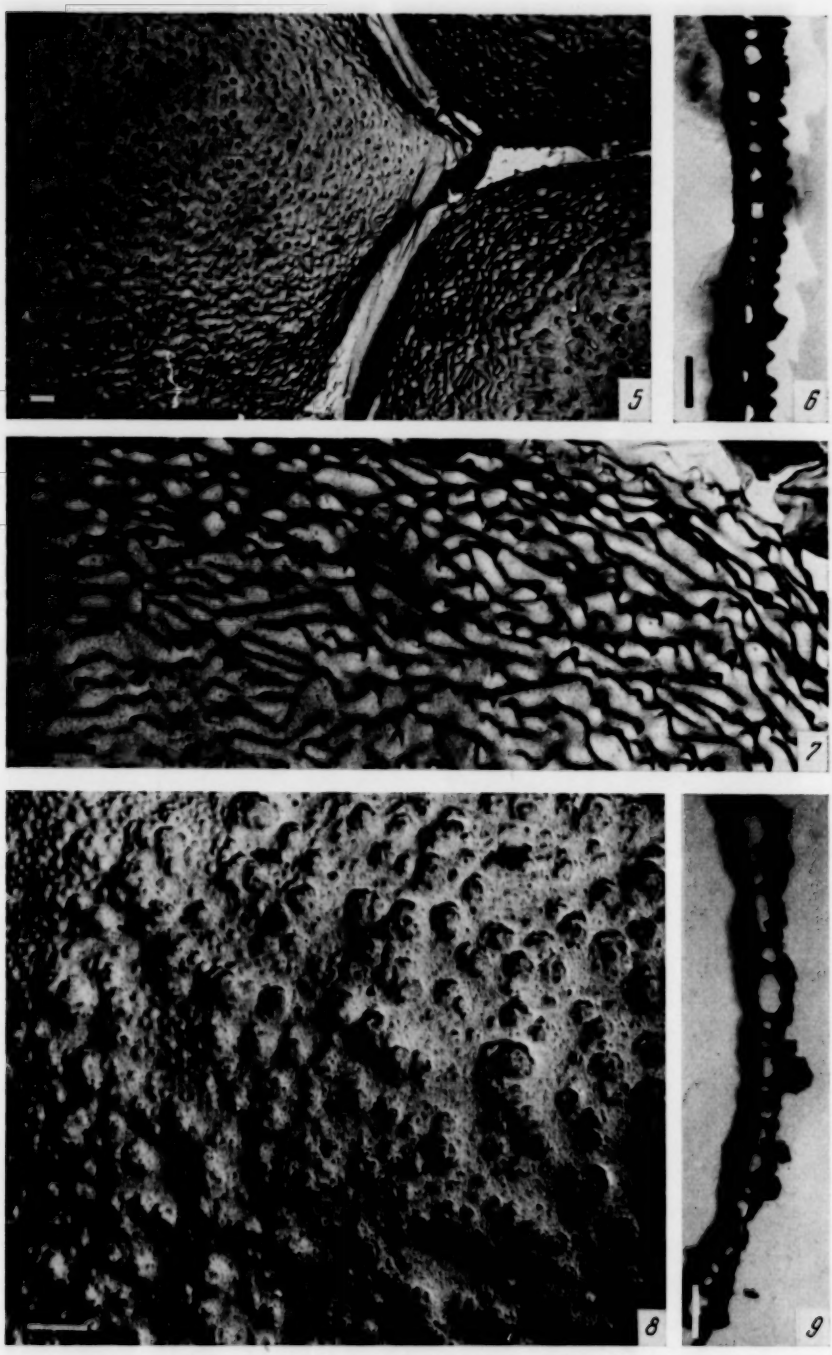


Abb. 3. Fig. 5. Pollenkörner von Fagus silvatica. Vergr. 3200 ×. Fig. 6. Schnitt durch das Sporoderm. Vergr. 6700 ×. Fig. 7. Ausschnitt aus der Pollenoberfläche von Fagus. Vergr. 8800 ×. Fig. 8. C-Abdruck von Quercus robur-Pollen. Vergr. 8200 ×. Fig. 9. Schnitt durch die Membran. Vergr. 6900 ×.

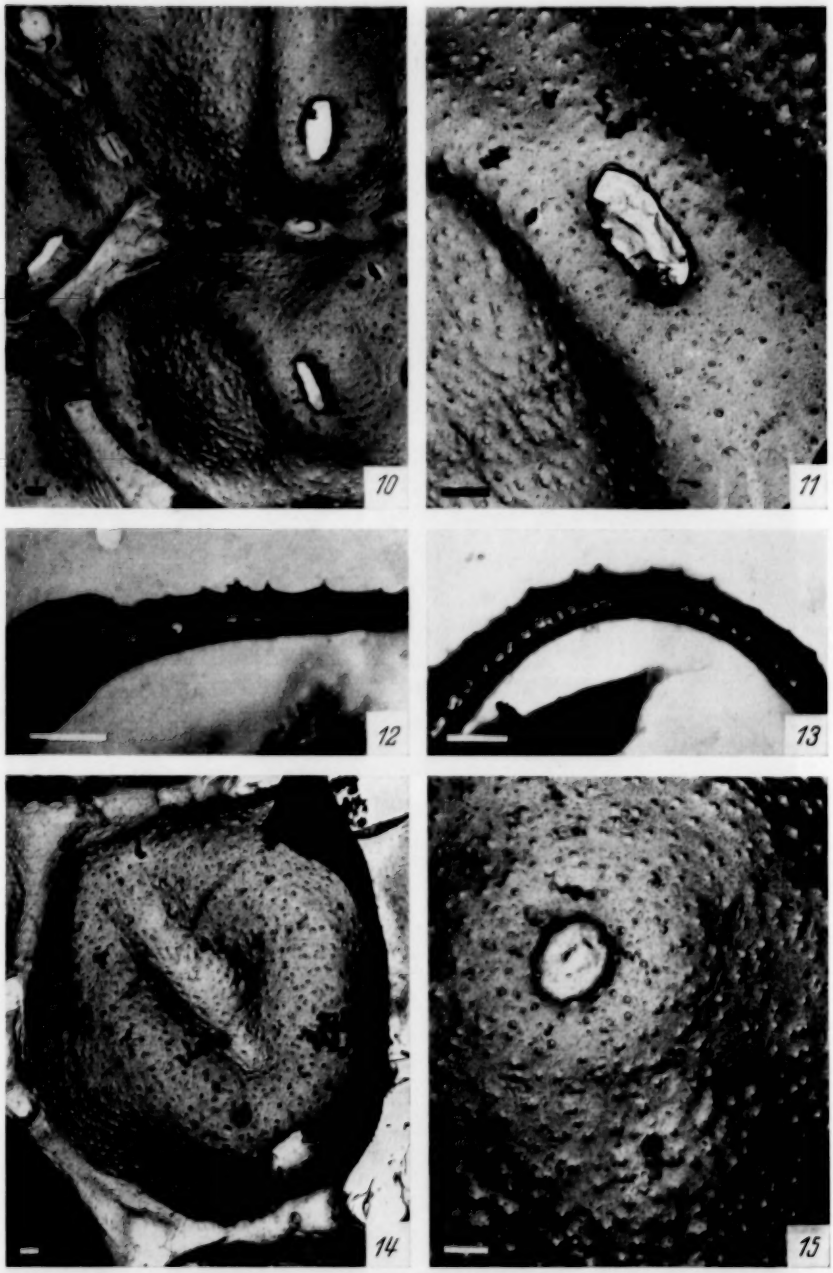
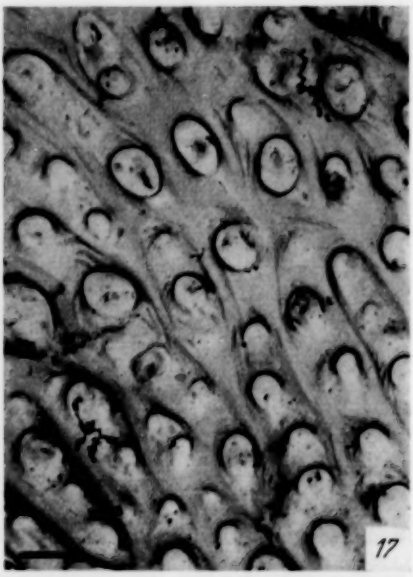
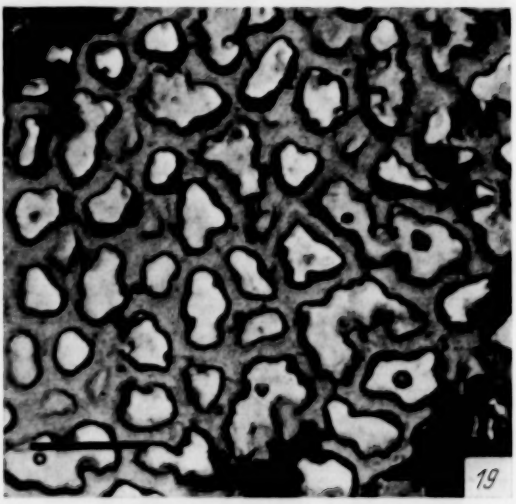


Abb. 4. Fig. 10. Pollenkörner von Alnus rotundifolia. Vergr. 2300 ×. Fig. 11. Austrittsstelle des Pollenschlauches mit Verstärkungsleisten. Vergr. 6300 ×. Fig. 12. Schnitt durch die Wand. Vergr. 10000 ×. Fig. 13. Schnitt durch das Sporoderm von Corylus avellana. Vergr. 8000 ×. Fig. 14. Übersichtsaufnahme eines Pollenkornes von Corylus avellana. Vergr. 2400 ×. Fig. 15. Abdruck der Keimpore. Vergr. 5800 ×.





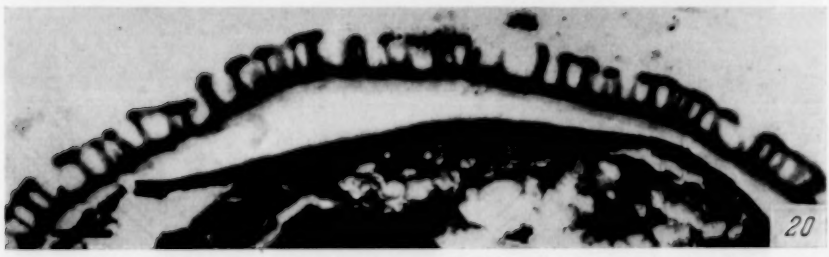
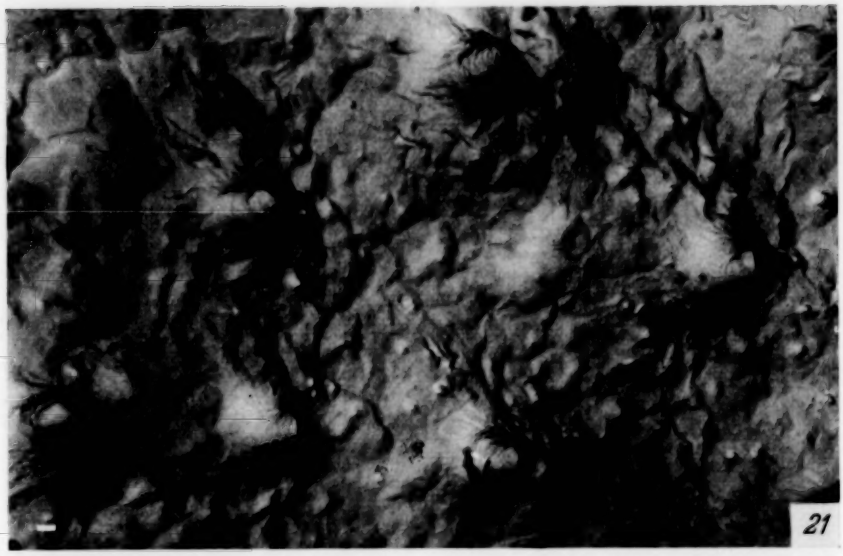


Abb. 5. Fig. 16. Pollenkorn von Petunia hybrida. Vergr. 1800 ×. Fig.. 17 Abdruck der reticulaten Sexine. Vergr. 6900 ×. Fig. 18: Pollen von Aeschynanthus lobbianus. Vergr. 3700 ×. Fig. 19. Ausschnitt aus der Oberfläche. Vergr. etwa 15000 ×. Fig. 20. Schnitt durch das Sporoderm. Vergr. 7200 ×.



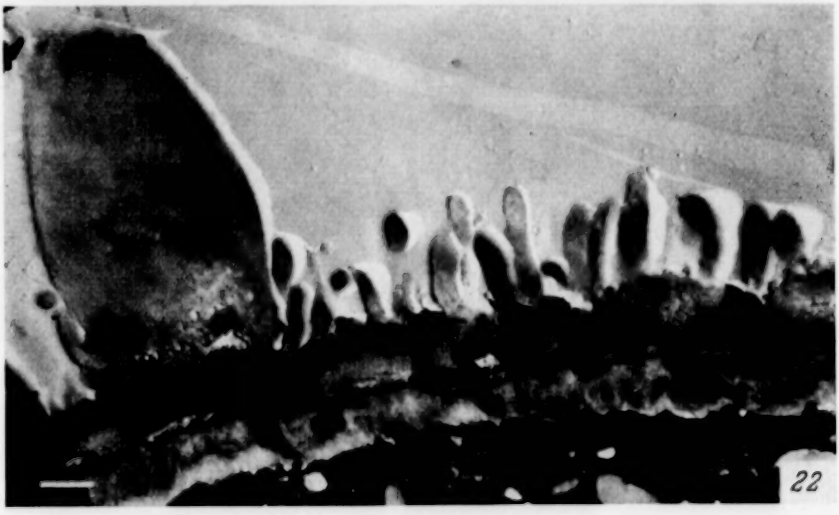


Abb. 6. Fig. 21. Oberfläche von Cucurbita pepo-Pollen. Vergr. 2300×. Fig. 22. Schnitt durch die Membran. Vergr. 7000×. Fig. 23. Randpartie des Pollenabdruckes. Vergr. 220×.

Zusammenfassung.

Als Ergänzung zu den heute gebräuchlichen Dünnschnittmethoden entwickelten wir ein einfaches Abdruckverfahren für Pollenkörner mit Hilfe von aufgedampften Kohlehäuten. Anhand von Abdruck- und Schnittaufnahmen kann der submikroskopische Bau der Membran im Elektronenmikroskop eindeutig abgeklärt werden. Als Objekte für unsere Untersuchung wählten wir Pollen von *Pinus nigra*, *Alnus rotundifolia*, *Corylus avellana*, *Fagus silvatica*, *Quercus robur*, *Petunia hybrida*, *Aeschynanthus lobbianus* und *Cucurbita pepo*. Eine Zusammenstellung der wichtigsten Bezeichnungen der Sporoderm-Elemente sowie eine Skizze der verschiedenen Membrantypen ergänzen die elektronenmikroskopischen Befunde.

Literatur.

Afzelius, B. M., G. Erdtman und F. S. Sjöstrand: On the fine structure of the outer part of the spore wall of Lycopodium clavatum as revealed by the electron microscope. Sv. bot. Tidskr. **48**, 155 (1954). — Bradley, D. E.: Evaporated carbon films for use in electron microscopy. Brit. J. Appl. Phys. **5**, 65 (1954). — Erdtman, G.: Pollen Morphology and Plant Taxonomy of Angiosperms. Stockholm: Almquist & Wikseel 1952. — Faegri, K., u. J. Iversen: Textbook of Modern Pollen Analysis. Kopenhagen: Ejnar Munksgaards 1950. — Fernández-Morán, H., und A. O. Dahl: Electron microscopy of ultrathin frozen sections of pollen grains. Science (Lancaster, Pa.) **116**, 465 (1952). — Frey-Wyssling, A., K. Mühlethaler u. R. W. G. Wyckoff: Mikrofibrillenbau der pflanzlichen Zellwände. Experientia (Basel) **4**, 475 (1948). — Helmcke, J. G., u. W. Krieger: Feinbau von Diatomeenschalen in Einzeldarstellungen. Z. wiss. Mikrosk. **60**, 85 (1951). — Jentys-Szafer, J.: La structure des membranes du pollen de Corylus, de Myrica et des espèces européennes de Betula et leur détermination a l'état fossile. Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. Math., Sér. B **1928**, 75. — König, H., u. G. Helwig: Über dünne aus Kohlenwasserstoffen durch Elektronen- oder Ionenbeschuß gebildete Schichten. Z. Physik **129**, 491 (1951). — Mahl, H.: Ein plastisches Abdruckverfahren zur übermikroskopischen Untersuchung von Metalloberflächen. Metallwirtsch. **19**, 488 (1940). — Mühlethaler, K.: Electron microscopy of developping plant cell walls. Biochim. et Biophysica Acta **5**, 1 (1950). — Untersuchungen über die Struktur der Pollenmembran. Mikroskopie (Wien) **8**, 103 (1953). — Robert, L., J. Bussot et J. Buzon: Utilisation de films de graphite en microscopie électronique. C. R. 1. Congr. Internat. de Micr. Electr. Paris 1950, p. 528, Paris 1953. — Sitte, P.: Untersuchungen zur submikroskopischen Morphologie der Pollen- und Sporenmembranen. Mikroskopie (Wien) **8**, 290 (1953). — Wodehouse, R. P.: Pollen Grains. New York 1935.

Dr. K. Mühlethaler, Zürich 6 (Schweiz), Inst. f. Allgem. Botanik d. E. T. H., Laboratorium f. Elektronenmikroskopie.

Planta, Bd. 46, S. 14—18 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität München.

ÜBER DIE ANALYSE VON SCHEITELMUSTERN*.

Von

ALFRED BARTHELMESS.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 30. März 1955.)

In seiner Arbeit "Phyllotaxis . . ." (1951) findet RICHARDS auf dem Wege mathematischer Ableitung bei Spiralstellungen nach dem Fibonacci-Prinzip einen engen Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl jener Parastichen, die sich rechtwinklig schneiden, und den radialen Abstandsverhältnissen entwicklungsgeschichtlich aufeinanderfolgender Organe von der Scheitelachse, einem Quotienten, den er "plastochrone ratio" (r) nennt. Diesem Zusammenhang hat er in einem Diagramm (1951, Fig. 6) Ausdruck verliehen, in welchem jedem der verschiedenen Ortsmuster ein Punkt zukommt, dessen Abszisse durch die Summe der (orthogonalen) Parastichen, dessen Ordinate durch das zugehörige Plastochron-Verhältnis festgelegt ist. Man sollte nach dieser Art der graphischen Darstellung wie auch nach dem Text der Legende hiezu ("Relation between phyllotaxis index and the logarithm of the sum of the numbers of parastichies in a wide variety of orthogonal phyllotaxis systems.") annehmen, daß für jeden Punkt des Diagramms die mathematische Beziehung zwischen Ordinate und Abszisse dieselbe ist. Dies ist jedoch *nicht* der Fall, wovon man sich am einfachsten durch Nachkonstruktion der betreffenden Stellungsmuster überzeugen kann. Sie gelingt nämlich nur für alle einfachen Spiralstellungen (1 Organ je Plastochron), nicht aber bei den multijugaten Spiralstellungen und den Stellungen aus alternierenden Wirteln. Auch RICHARDS' Abbildung eines bijugaten (4+6)-Systems in der diesbezüglichen Kritik ist nicht mit dem r-Wert seines eigenen Diagramms (1951, Fig 6) konstruiert, sondern mit dem meiner Abb. 11 (AO/BO = BO/CO = 1,27, nicht 1,13). Ebenso unmöglich ist die Nachkonstruktion mit seinen Werten für Wirtelsysteme. Als Beweis seien in Abb. 1 zwei Scheitelmuster 5-gliedriger alternierender Wirtel wiedergegeben, von denen nur das linke (mit dem r-Wert meines Diagramms), nicht aber das rechte (mit dem r-Wert aus Fig. 6 nach RICHARDS) orthogonalen Schnitt der Parastichen ergibt.

* Erwiderung zu der Arbeit von F. L. RICHARDS: Planta **45**, 198—207 (1955).

Meine Abb. 11 (1954) ist also durchaus nicht „vollkommen falsch". Sie enthält lediglich genau wie meine Abb. 10 nur Werte *gleicher* Funktion, nämlich nur die „unmittelbaren", von RICHARDS nun „experimentell" genannten, besser aber als „empirisch" zu bezeichnenden r-Werte, während RICHARDS' Fig. 6 neben den empirischen r-Werten (für die einfachen Spiralsysteme) auch „berichtigte" Werte (für die multijugaten Spiralsysteme und die alternierenden Wirtel) verwendet, ohne daß dies im Diagramm oder der Legende dazu kenntlich gemacht

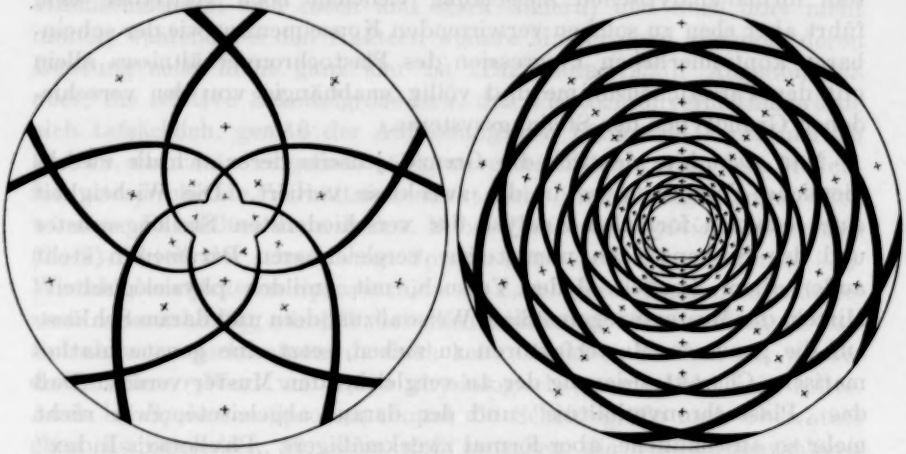


Abb. 1a u. b. Schematische Nachkonstruktion zweier Scheitelquerschnitte mit 5gliedrigen alternierenden Wirteln. Fig. 1a. $r = 1{,}8415\sqrt[5]{21{,}175}$ (nach BARTHELMESS); Fig. 1b. $r = 1{,}13$ (nach RICHARDS').

wäre. Es ist aber zumindest ungewöhnlich und leicht irreführend, in ein und demselben Diagramm Werte verschiedener Bedeutung zu benützen.

Der Zweck der von RICHARDS bei bestimmten Werten vorgenommenen „Berichtigung" ist, das Faktum der mehrfachen Organbildung je Plastochron bei solchen Systemen theoretisch zu eliminieren, um sie mit einfachen Systemen vergleichen zu können. Das bijugate (4+6)-System leitet sich vom korrespondierenden unijugaten (2+3)-System zunächst einmal dadurch ab, daß zwischen zwei Plastochrone des letzteren (also z. B. zwischen Primordium C und A in der linken oberen Figur vorstehender Arbeit von RICHARDS) noch ein weiteres Plastochron eingeschoben wird, das ein Primordium (B) in winkelhalbierender Stellung ausgliedert. Einem Plastochron der (2+3)-Stellung entsprechen also 2 Plastochrone der (4+6)-Stellung (nicht umgekehrt). *Deswegen* ist $r_{\text{bijug}} = \sqrt[2]{r_{\text{unijug.}}}$. Außerdem aber unterscheidet sich das bijugate (4+6)-System vom unijugaten (2+3)-System noch dadurch, daß bei

ersterem je Plastochron *zwei* Organe (simultan und opponiert) entstehen. Wie man aber aus der mittleren Figur in RICHARDS' Abbildung ohne weiteres sieht, wirkt sich *dieses* Faktum auf den empirischen *r*-Wert *überhaupt nicht* aus. Man kann also auch nicht sagen, daß diese doppelte Organbildung eines Plastochrons der einfachen Organbildung zweier Plastochrone „entspreche" ("refers to"). Wenn man aber einen Wert, der sich durch das Hinzukommen der doppelten Organbildung nicht ändert, trotzdem willkürlich „berichtigt", dann mag das im Sinne einer rein formal-analytischen Zielsetzung vielleicht noch vertretbar sein, führt aber eben zu solchen verwirrenden Konsequenzen wie der scheinbaren kontinuierlichen Progression des Plastochronverhältnisses allein mit der Parastichensumme und völlig unabhängig von den verschiedenen Grundtypen der Stellungssysteme.

Man sieht hier deutlich die Grenze, jenseits derer sich die zweckdienliche Formalanalyse in die zwecklose verliert. Die Wichtigkeit einer exakten formalen Analyse der verschiedensten Stellungsmuster und des Suchens nach unmittelbar vergleichbaren Parametern steht außer allem Zweifel. Jeder Versuch, mit „milden physiologischen" Mitteln das Muster in regelmäßiger Weise abzuändern und daraus Schlüsse auf die genuinen Musterfaktoren zu ziehen, setzt eine genaue mathematische Charakterisierung der zu vergleichenden Muster voraus. Daß das „Plastochronverhältnis" und der daraus abgeleitete, zwar nicht mehr so anschauliche, aber formal zweckmäßigere „Phyllotaxis-Index" bzw. „Equivalent Phyllotaxis Index" hiezu ausgezeichnete Hilfsmittel sind, ist ebenfalls sicher. Formale und kausale Analyse können auch gewiß ganz unabhängig voneinander betrieben werden. Es wird aber wohl immer als entschieden wertvoller angesehen und daher auch immer wieder versucht werden, beide miteinander zu verknüpfen. Wie groß die Verlockung hiezu ist, zeigt die vorliegende Kontroverse auf beiden Seiten deutlich. RICHARDS betont zwar, daß es ihm nur um die Formalanalyse gehe; den von ihm zitierten Sätzen ließen sich aber auch anderslautende gegenüberstellen, so z. B. (1951, S. 538): ". . . the plastochrone ratio, when considered in relation to the plastochrone period, will frequently give valuable information concerning growth rates within the apex. Finally, the methods, being based entirely on strict analysis, provide data, with which any theory of leaf positioning must be in harmony". Ebenso zeugt dafür sein Versuch, ein formalanalytisches Ergebnis, nämlich die angebliche kontinuierliche Progression der *r*-Werte, kausalanalytisch zu stützen. In dem angenommenen Modellfall (sukzessive Einführung einzelner Parastichen in ein ursprüngliches (4+4)-Wirtelsystem) müßten die *empirischen* *r*-Werte abwechselnd scharf ansteigen und abfallen. Da dies unwahrscheinlich sei, andererseits aber dem Modellfall entsprechende Stellungswechsel z. B. bei Kak-

teen und Blütenständen von Dipsacaceen tatsächlich „oft" vorkämen, könnten die empirischen r-Werte der multijugaten Spiralstellungen und Wirtelstellungen nicht „richtig" sein. Nun sind aber umgekehrt Stellungswechsel wie der im Modellfall angenommene in der Natur, wenigstens innerhalb einer bestimmten Organbildungsphase (z. B. der der Laubblätter) praktisch fast nie verwirklicht; bei den Dipsacaceen erfolgt der Wechsel nur beim Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Region (wo aber auch Form und Größe des Scheitels, also seine Wachstumsraten sich rasch und stark ändern) und auch dort nicht immer, während bei den Kakteen weitere Muster dazu kommen, deren Deutung noch nicht ganz klar ist (Bilhuber 1933). Angenommen aber, die relative Scheitelgröße bzw. das Plastochronverhältnis würde sich tatsächlich, gemäß der Auffassung von Richards, kontinuierlich ändern, dann wäre es gerade völlig unverständlich, warum dem Modellfall entsprechende Verhältnisse nicht sehr viel häufiger angetroffen würden. Es müßten dann doch z. B. bei *Juniperus virginiana* neben den (2+2)-Wirteln der schwächeren Sprosse mit $r = 1{,}497$ und den (3+3)-Wirteln der stärkeren Sprosse mit $r = 2{,}340$ (nach Richards) mindestens ebenso häufig, nämlich bei allen mittleren Sproßstärken (2+3)-Spiralmuster vorkommen, da doch kein Grund einzusehen ist, warum der mittlere r-Wert von 1,609 physiologisch „unmöglich" sein sollte. Auch bei *Equisetum*-Sprossen nimmt die Scheitelgröße nach oben stets ganz kontinuierlich ab, ohne daß zwischen die verschiedenzahligen Wirtel etwa die den „intermediären" r-Werten entsprechenden Spiralmuster eingeschaltet würden. In der ganzen Blattstellungsliteratur liegt keine Angabe vor, daß je einmal in einem Kompositen-Köpfchen ein bijugates Spiralmuster oder gar ein Wirtelmuster gefunden worden wäre, obwohl dort doch fast immer Stellungswechsel zu beobachten ist. Man könnte also eher sagen: Eben *weil* die empirischen r-Werte abwechselnd ansteigen und absinken müßten, finden sich Stellungswechsel wie der im Modellfall angenommene normalerweise nicht verwirklicht. Der wahre Grund liegt aber wohl darin, daß spiralige und wirtelige Systeme durch außerordentlich wirksame idiotypische Faktoren fast unüberbrückbar unterschieden sind, Faktoren, die von der Kausalanalyse gesucht, von der Formalanalyse aber gerade eliminiert, sozusagen geleugnet werden. Hierin liegt offenbar die Quelle der so häufigen Mißverständnisse.

Daß im übrigen die Berücksichtigung dreidimensionaler Determinationsräume für die formale Analyse und Charakterisierung der Muster sehr schwierige mathematische Probleme bringen würde, ist leider nicht zu bezweifeln. Daß es nicht unmöglich sein muß, hat van Iterson bereits zu zeigen versucht (1883, S. 77—94, 175—178 u. Tafel IV und V); vor ihm haben sich übrigens schon, unabhängig voneinander, Airy,

Delpino und Schwendener für dieses Ziel eingesetzt. Auch ist es vielleicht nur vorläufig unmöglich, diese primordialen Determinationsräume histologisch zu identifizieren; man denke nur an die Erfolge der tierischen Embryologie und die ersten Versuche, bei Pflanzen ähnliches mittels chromosomaler Aberrationen (Dermen, Satina, Blakeslee und Avery) oder chlorophylldefekter Plastiden (Renner und Mitarbeiter) zu erreichen.

Die Kritik an der entwicklungsphysiologischen Bedeutung des Plastochronverhältnisses war ursprünglich ausgelöst durch die Konsequenzen der Fig. 6 von Richards, d. h. durch die Unmöglichkeit, das formalanalytische Ergebnis der angeblich kontinuierlichen Progression der r-Werte unabhängig vom Stellungstyp als alleinige Funktion der Parastichenzahl mit den Tatsachen der Musterbildung in Übereinstimmung zu bringen. Es ist aber nun klar, daß dieses Dilemma nicht durch eine andere Definition der "plastochrone ratio" behoben werden kann. Es existiert überhaupt nur bezüglich der „berichtigten" Werte. Für die empirischen Werte [also die in meiner Abb. 11 (1954) verwendeten] ist die Übereinstimmung zwischen formaler und kausaler Bedeutung ohne weiteres klar und damit die Brauchbarkeit dieses Parameters außer Frage gestellt.

Literatur.

Barthelmess, A.: Über Musterbildung am Sproßscheitel der Phanerogamen. I. Mitt. Planta (Berl.) **43**, 393—410 (1954). — Iterson jr., G. Van: Mathematische und mikroskopisch-anatomische Studien über Blattstellungen. Jena 1907. — Richards, F. J.: Phyllotaxis: Its quantitative expression and relation to growth in the apex. Philosophic. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B **235**, 509—564 (1951). — Über einige Fragen betreffend die Messung von Blattstellungen. Planta (Berl.) **45**, 198—207 (1955).

Dr. A. Barthelmess, Botanisches Institut der Universität München, München 38, Menzingerstr. 67.

Planta, Bd. 46, S. 19—45 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN UMSATZ DER CHLOROGENSÄURE IN HÖHEREN PFLANZEN.

Von

HEIDI RUCKENBROD.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. April 1955.)

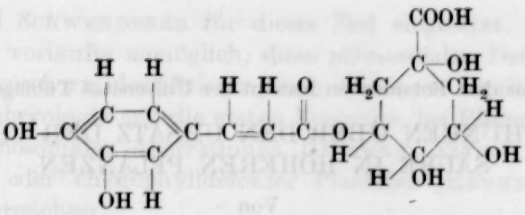
Einleitung.

Untersuchungen von Umsatz und Biosynthese aromatischer Verbindungen wurden bisher in den meisten Fällen an Mikroorganismen vorgenommen. Hier ist Einheitlichkeit des Materials gewährleistet und die Verwendung von Mutanten wie auch Fütterung von markierten Zwischenprodukten ohne Schwierigkeiten möglich. Unsere Kenntnis der Biosynthese der Aromaten beruht im wesentlichen auf diesen Versuchen (DAVIS und Mitarbeiter 1952/53) und ist bereits mehrfach diskutiert worden (EHRENSVÄRD 1954). Für höhere Pflanzen liegen bisher nur verhältnismäßig wenige Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex vor [THIMANN, EDMONSON und RADNER (1951), GEISSMAN und HINREINER (1952)]. PAECH und EBERHARDT (1952) berichten über die Biosynthese von Anthocyanen, DANNER (1940) über den Stoffwechsel von Arbutin. Durch künstlich zugeführten Zucker kann in höheren Pflanzen Anthocyansynthese ausgelöst werden. Es wird angenommen, daß die Synthese von „sekundären Pflanzenstoffen" Zeichen eines besonders intensivierten Stoffwechsels und nicht einer einfachen Stoffansammlung in der Pflanze ist (vgl. PAECH 1950). Für die Anthocyansynthese scheint dies zuzutreffen, da bei der Bildung dieser Farbstoffe aus Zucker stets ein Atmungsanstieg zu beobachten ist.

Untersuchungen solcher Pflanzenstoffe sind nur möglich, wenn sie in geeigneten Versuchsobjekten in hinreichender Menge gebildet werden und durch spezifische Reaktionen quantitativ erfaßbar sind. Wir haben unser Interesse der Chlorogensäure zugewandt, die in den letzten Jahren mehrfach aus Pflanzen isoliert und auf ihre physiologische Bedeutung hin untersucht worden ist.

Chlorogensäure wurde von GORTER (1908—1911) und später von FREUDENBERG (1920) aus grünen Kaffeebohnen isoliert und in ihrer Konstitution aufgeklärt.

Sie ist ein Depsid, zusammengesetzt aus einem Molekül Chinasäure und einem Molekül Kaffeesäure, die esterartig miteinander verknüpft sind (s. Formel).



In Kaffeebohnen ist ein großer Teil des Coffeins wahrscheinlich komplex an das Chlorogensäuremolekül gebunden. Es kann durch Ausschütteln mit Chloroform abgetrennt werden.

Der Nachweis von Chlorogensäure geschah früher durch Farbreaktionen 1. mit Eisen-3-chlorid (Grünfärbung), 2. mit HÖPFNERs Reagens ($NaNO_2$ in 10% Essigsäure, Gelbfärbung, HÖPFNER 1932).

Auf diesen Reaktionen beruhen die Angaben über die Verbreitung von Chlorogensäure in höheren Pflanzen (WEHNER und HADDERS in KLEIN 1931/33, POLITIS 1947). Folgende Familien scheinen durch ihren Gehalt an Chlorogensäure erwähnenswert: *Rubiaceae*, *Ranunculaceae*, *Solanaceae*, *Compositae*, *Saxifragaceae*, *Labiatae*, *Gramineae*. Die dort angewandten Nachweisreaktionen können wegen ihrer Unspezifität jedoch nicht als eindeutig angesehen werden, da auch andere phenolhaltige Gerbstoffe ähnliche Reaktionen geben. Es ist aber anzunehmen, daß Chlorogensäure eine weitere Verbreitung besitzt, als man bisher angenommen hatte. Inzwischen liegen papierchromatographische Nachweise für folgende Pflanzen vor: *Camellia sinensis*, Blätter (ROBERTS und WOOD 1951); *Nicotiana tabacum*, Blätter (ROBERTS und WOOD 1951); *Apfel und Birne*, Früchte (WEURMAN und SWAIN, HULME 1953); *Solanum tuberosum*, Knolle (JOHNSON und SCHAAL 1952); *Prunus persica*, Früchte (CORSE 1953); *Crataegus spec.*, Früchte (FIEDLER 1954); *Ipomoea batatas*, Knolle (RUDKIN und NELSON 1947); *Eucommia*, Blätter (GUSEVA 1954).

In mehreren Untersuchungen wurde die physiologische Bedeutung der Chlorogensäure für einige Pflanzen aufgedeckt. RUDKIN und NELSON (1947) stellten eine erhöhte Atmung von Stücken von *Ipomoea batatas* fest, denen sie Chlorogensäure zugesetzt hatten. Chlorogensäure wirkt demnach auf Grund ihrer Diphenolnatur als Substrat für Polyphenoloxydasen. Diese haben wahrscheinlich in höheren Pflanzen neben dem WARBURGschen Cytochromsystem bei der Endoxydation des anfallenden Wasserstoffs Bedeutung.

In Kartoffeln soll Chlorogensäure als Schutzfaktor gegen Befall von *Streptomyces scabies*, dem Erreger des Kartoffelschorfs, wirksam sein (JOHNSON und SCHAAL 1952). Kartoffelsorten, die einen besonders hohen Gehalt an Chlorogensäure aufwiesen, waren resistenter als solche mit niedrigem Gehalt.

Nach Simonds, Johnson und Schaal (1953) fördert Chlorogensäure die Korkbildung bei Kartoffeln anscheinend über die Oxydationswirkung der Tyrosinase.

Eine Bearbeitung der Chlorogensäure erschien demnach aus mehreren Gründen lohnend. Ihr Vorkommen in den verschiedensten Familien zeigt, daß die Fähigkeit zur Bildung dieser Verbindung bei Pflanzen allgemeiner verbreitet ist, als man das bisher annahm, und deshalb Beachtung verdient. Diese Verbindung besteht nun aus einem ungesättigten alicyclischen Ring, der Chinasäure, und einem Phenyl-Propanderivat, der Kaffeesäure. Hier erhebt sich zunächst die Frage, wie ihre Moleküle entstehen, insbesondere ob ein Zusammenhang zwischen der Bildung beider Komponenten besteht oder ob diese unabhängig voneinander im Stoffwechsel der Pflanzen anfallen. Chinasäure finden wir häufiger frei in verschiedenen Pflanzen (z. B. *Fichte, Apfelfrucht*). Kaffeesäure kann frei vorkommen *(Coffea arabica, Clematis vitalba)*, liegt aber wegen ihrer geringen Löslichkeit meist gebunden vor. Sie findet sich als Vertreter der Phenyl-Propanabkömmlinge in einigen Flavonen und Anthocyanen gekoppelt an Phloroglucin. Nicht nachgewiesen, aber wahrscheinlich ist, daß hier das intakte Molekül in die Verbindung eintritt. So spielt also die Kaffeesäure eine wichtige Rolle für den Aufbau der verschiedensten sekundären Pflanzenstoffe.

Den höheren Pflanzen scheint demnach die Synthese des Phenyl-Propangerüstes allgemein zuzukommen. Damit rückt auch die Chlorogensäure in den Vordergrund stoffwechselphysiologischer Interessen. Da über ihren Umsatz und vor allem über die Bedingungen ihrer Synthese noch nichts bekannt war, haben wir uns in der Hauptsache diesen Fragen zugewandt und versucht, mit der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zum Problem der Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe zu leisten.

Material und Methode

Wie bereits gesagt, fehlte bisher eine quantitative Methode, um geringe Mengen von Chlorogensäure bestimmen zu können. Diese wurde bei Beginn unserer Untersuchungen ausgearbeitet (vgl. Paech und Ruckenbrod 1953).

Das zur Verwendung bestimmte Pflanzenmaterial (Blätter, Keimlinge, Früchte) wird entweder in kochendem 96%igem Äthylalkohol eine Minute aufgekocht oder mit einer 1%igen Natriumbisulfitlösung übergossen, um die vorhandenen Phenoloxydasen zu zerstören, die beim Zerreiben eine Oxydation der Chlorogensäure in den Pflanzenteilen bewirken. Die Pflanzenteile werden dann mit etwas Quarzsand zerrieben und dreimal mit etwa der 10fachen Menge des Ausgangsgewichtes 70%igen Äthylalkohols bei 50—55° C ein bis zwei

Stunden erschöpfend extrahiert. Nach Absaugen kann das Filtrat im Vakuum bei 50° C bis auf 10 ml eingeengt werden.

Von diesen rohen Pflanzenextrakten wurden zum qualitativen Nachweis der Chlorogensäure 0,01 ml für papierchromatographische Bestimmungen verwendet. Die chromatographische Trennung: Wir benutzten die absteigende Methode (vgl. CRAMER 1952) mit dem Entwicklungsgemisch Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), unter Verwendung der Papiere Whatman Nr. 1, Schleicher-Schüll Nr. 2045 und 2043. Es wurden Streifen von 45 cm Länge und 14 cm Breite zurechtgeschnitten und 8 cm vom Rande entfernt auf die Startlinie Flecken von 0,01 ml der zu untersuchenden Substanz aufgetragen. Zur exakten Bestimmung eines Rf-Wertes mußte das Papier etwa 10 Stunden vor der Entwicklung im Entwicklungstrog an die auf dem Boden befindliche wäßrige Phase angeglichen werden, da sonst der Rf-Wert erheblichen Schwankungen unterlag. Die Temperatur im Trog betrug 20° C $\pm$ 0,5. Bei qualitativen Nachweisen ließen wir parallel eine Probe reiner Chlorogensäure als Vergleichssubstanz mitlaufen, die nach FREUDENBERG (1920) aus grünen Kaffeebohnen abgetrennt und gereinigt erhalten wurde. Nach dem Trocknen des entwickelten Papieres erscheint Chlorogensäure unter der UV-Lampe als mattblau fluoreszierender Fleck, der nach Bedampfen mit Ammoniak eine grüngelbe Farbe zeigt. Der Rf-Wert für Chlorogensäure beträgt unter den genannten konstanten Bedingungen 0,73 (bei einer Entwicklung bei 25° C: 0,76). Diese Werte schwanken in zahlreichen Bestimmungen um $\pm$ 0,02. Für die weitere Identifizierung sprühten wir das Papier entweder mit einer 1%igen alkoholischen Eisen-3-chlorid-lösung oder mit HÖPFNERs Reagens (1% Natrium-nitrit in 10%iger Essigsäure). Mit Eisen-3-chlorid färbt sich Chlorogensäure grün, mit HÖPFNERs Reagens gelb, diese Farbe schlägt nach anschließendem Besprühen mit NaOH in rot um (s. Tabelle 1).

Neben Chlorogensäure gelang es mit dieser Methode auch, die beiden Komponenten Kaffeesäure und Chinasäure nachzuweisen. Kaffeesäure zeigt auf dem Papier eine blaue Fluoreszenz, die nach Bedampfen mit NH_3 leuchtender blau erscheint. Sie hat einen Rf-Wert von 0,83. Mit HÖPFNERs Reagens gibt Kaffeesäure einen braunroten Fleck ohne Besprühen mit NaOH. Chinasäure zeigt keine Fluoreszenz. Da noch kein spezifisches Sprühreagens für Chinasäure gefunden wurde, konnten wir nur ihre Säurenatur durch Besprühen mit Bromphenolblau nachweisen. Wir verwendeten zur Sicherung unserer Ergebnisse außer Butanol-Eisessig-Wasser noch andere Entwicklungsgemische: 1. Butanol-85%ige-Ameisensäure-Wasser (4:1:5), 2. Eisessig-Wasser (15/85). Dieses Gemisch bewirkt einen Umtausch der Laufgeschwindigkeiten von Chlorogensäure und Kaffeesäure und hat eine sehr kurze Entwicklungsdauer (vgl. FIEDLER 1954). Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1.

	Rf (20°) Bu: Ess.	Rf (20°) Bu: Amsr.	Rf (20°) Ess.-Wasser	UV-Fluoreszenz		HÖPFNER-Reagens
				unmittelbar	+ NH_3	
Chlorogensäure .	0,73	0,75	0,75—0,79	blau	grüngelb	gelb
Kaffeesäure . . .	0,83	0,84	0,57—0,60	blau	hellblau	rotbraun
Chinasäure . . .	0,34	0,20	—	—	—	Bromphenolblau Säurefleck

Quantitative Bestimmung: Verwendung fand eine abgewandelte Methode, die sich für unsere Arbeiten als sehr günstig erwiesen hat. Aus dem Papier (Schleicher-Schüll Nr. 2043) werden im Abstand von 0,5 cm Sechsecke ausgeschnitten, der Extrakt wird auf die resultierenden Papierzungen punktförmig aufgetragen (s. Abb. 1 — vgl. SCHWERDTFEGER 1954).

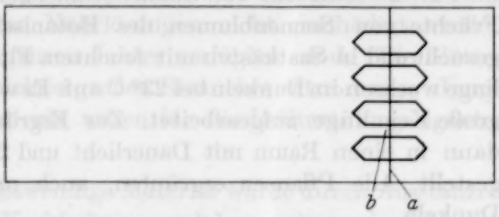


Abb. 1. *a* Startlinie; *b* Papierzungen.

Mit dieser Methode gelang eine schärfere Trennung der im Pflanzenextrakt enthaltenen Stoffe voneinander, als durch Auftragen eines kontinuierlichen Streifens erreicht werden konnte.

Von äthylalkoholischen Extrakten paralleler Versuchsproben, jeweils auf 10 ml eingeengt, werden 0,1 ml aufgetragen und, wie oben beschrieben, mit Butanol-Eisessiggemisch entwickelt. Nach dem Trocknen ist unter UV-Licht ein Streifen blaufluoreszierender Chlorogensäure zu erkennen. Dieser wird ausgeschnitten, in kleine Stücke zerteilt und mit 10 ml Aqua dest. bei Zimmertemperatur ausgelaugt. Nach Filtration kann die Konzentration dieser Lösung im Spektralphotometer (Zeiss Opton) an Hand der Extinktion im Absorptionsmaximum bestimmt werden. Durch Verwendung reiner Substanz verschiedener Konzentration wurde für dieses Verfahren eine Eichkurve gewonnen. Auf diese wurden die Ergebnisse bezogen. Chlorogensäure hat eine charakteristische Absorptionskurve mit einem Maximum bei 324 mμ und einem Minimum bei 260 mμ (vgl. JOHNSON und SCHAAL 1952).

Durch schwachalkalische Hydrolyse der Chlorogensäure mit 7% KOH und anschließende Neutralisation mit Schwefelsäure konnten wir papierchromatographisch stets nur den einen Partner, die Kaffeesäure, nachweisen. Nach Abtrennung erhielten wir für Kaffeesäure eine Absorptionskurve mit einem Maximum um 290 mμ und einem Minimum um 270 mμ.

Die erhaltenen Mengenwerte wurden bei Samen und Keimlingen auf die Anzahl der im Versuch verwendeten Objekte bezogen, bei

Blattmaterial auf das Frischgewicht. Die meisten Versuche wurden mit Blättern von *Hedera helix* durchgeführt, die durch ihre dicke Cuticula nach dem Abpflücken keine großen Wasserverluste erleiden. Die Schwankungen des Frischgewichtes waren deshalb nur gering. Wie Parallelbestimmungen aus gleichem Material zeigten, war die mittlere Abweichung $\pm$ 7%. Wir haben in unseren Versuchen über die Neubildung von Chlorogensäure nur die Werte als positiv angesehen, die eine Steigerung von mehr als 10% gegenüber der unbehandelten Wasserkontrolle aufwiesen.

Aufzucht von Keimlingen von Helianthus annuus.

Für die Aufzucht von Sonnenblumenkeimlingen wurden gleichgroße Früchte von Sonnenblumen des Botanischen Gartens Tübingen ausgesucht und in Saatkästen mit feuchtem Flußsand ausgelegt. Die Keimlinge wuchsen im Dunkeln bei 23° C auf. Es wurden dann jeweils 25 gleichgroße Keimlinge aufgearbeitet. Zur Ergrünung wurden die Keimlinge dann in einen Raum mit Dauerlicht und 20° C konstanter Temperatur gestellt. Alle Pflanzen ergrünten, auch nach 10tägiger Aufzucht im Dunkeln.

Reifende Früchte von Helianthus annuus.

Es wurden drei Pflanzen von *Helanthus annuus* ausgewählt, deren Blütenstände für die beabsichtigten Messungen genügend Früchte enthielten. Kurz nach der Befruchtung wurden die Blütenstände mit weißen Tüchern zugebunden und der Reife überlassen. Sie standen im Freien, an einem sonnigen Standort in einer Gärtnerei in Tübingen. Alle 10 Tage wurden Portionen von 50, später 25 Früchten entnommen und zur Chlorogensäure-, Fett- und Atmungsbestimmung verwendet.

a) Atmungsmessungen wurden in einer Warburgapparatur (System MÖHLE) vorgenommen. Die Warburggefäße hatten Erlenmeyerform und einen Bodendurchmesser von 40 mm. Jedes Gefäß enthielt im Außenraum 0,2 ml Wasser und im inneren Einsatz entweder 0,2 ml KOH (11%) oder die gleiche Menge Aqua dest. Ein Gefäß konnte mit 6 Früchten beschickt werden. Es wurden bei jeder Bestimmung zwei parallele Messungen durchgeführt. Die Ablesegenauigkeit beträgt bei dieser Apparatur 0,5 mm, das sind bei einer durchschnittlichen Gefäßkonstanten von 2 etwa 1 mm^3 O_2 bzw. CO_2. Die Temperatur des Wasserbades betrug 22° C.

b) Die Bestimmung der Chlorogensäure wurde anschließend an die Warburgmessungen mit den gleichen Früchten nach oben beschriebener Methode durchgeführt. Es wurden sowohl Samen wie auch die Fruchtschalen verarbeitet.

c) Zur Bestimmung des Fettgehaltes haben wir die Methode nach Paech und Simonis (1952) angewendet. Die Früchte wurden zerschnitten, mit trockenem Na_2SO_4 im Mörser zerrieben und in einem Soxhlet-Apparat mit Petroläther 6 Stunden extrahiert. Der Petroläther wurde bis auf wenige ml abgedampft, die Lösung mit dem Fett in einen vorher ausgewogenen Erlenmeyerkolben gefüllt, bei 80° C getrocknet und anschließend gewogen.

Blattversuche mit Hedera helix.

Fütterungsversuche mit nachfolgender Chlorogensäurebestimmung wurden hauptsächlich an Efeublättern unternommen. Sie erwiesen sich hierfür als besonders geeignet, weil sie durch Infiltration und Fütterung mit Rohrzucker und anderen Nährlösungen nicht geschädigt werden und weil sie während des ganzen Jahres verfügbar sind. Die Blätter wurden blütenlosen Zweigen eines großen Strauches entnommen. Junge Blätter mit noch dünner Cuticula waren für die Infiltration geeigneter als ältere.

Das für die Messungen notwendige Material wurde durch Ausstanzen von Scheibchen (mit einem Korkbohrer von 1,1 cm ⌀) aus der erforderlichen Anzahl von Blättern gewonnen. Auf die Einzelmessungen wurden Scheibchen gleicher Herkunft so verteilt, daß dadurch die Unterschiede ausgeschaltet wurden, die zwischen den Regionen der Blätter bestehen können. Das Material für die Einzelmessungen und Kontrollen bestand also aus Blattstücken von entsprechenden Stellen aller für die Reihe verarbeiteten Blätter.

Für einen Versuch wurden 30 Blattscheiben, d. h. 30 cm^2 Blattfläche benutzt. Die Stücke wurden mit den entsprechenden Lösungen infiltriert, nach dem Ausdunsten auf die infiltrierte Lösung in Petrischalen, mit der Unterseite nach oben, aufgelegt und für die Dauer des Versuches in einem Raum mit konstanter Temperatur (20°) und 12stündiger Beleuchtung aufgestellt.

Geschädigte Blätter konnten an einem deutlich braunen Rand sofort erkannt werden. Die Lösungen wurden regelmäßig gewechselt, damit kein Pilzwachstum auftrat. Die Bestimmung der Chlorogensäure erfolgte wie oben beschrieben.

Versuche mit Blättern von *Coffea arabica* und *Ipomoea coccinea* wurden nach der gleichen Methodik durchgeführt, manche auch mit ganzen Blatthälften, die von der Mittelrippe abgetrennt waren.

Atmungsmessungen mit Efeublattstücken wurden nach der bereits für *Helianthus annuus* beschriebenen Methode vorgenommen; statt Früchte wurden hier 6 Blattscheiben, d. h. 6 cm^2 verwendet.

Versuchsergebnisse.

1. Der Nachweis von Chlorogensäure in einigen Pflanzen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Versuchsobjekt für unsere stoffwechselphysiologischen Untersuchungen haben wir in Bestätigung und Erweiterung schon bekannter Vorkommen in folgenden Pflanzen Chlorogensäure gefunden: *Coffea arabica*, Blätter, Früchte; *Helianthus annuus*, Blätter, Keimlinge, Früchte; *Hedera helix*, Blätter, Sproßachse, Wurzeln; *Ipomoea coccinea*, Samen, Keimlinge, Blätter; *Aster chinensis*, Samen, Blätter; *Nicotiana tabacum*, Blätter; *Solanum tuberosum*, Blätter; *Pavetta* (Rubiac.), Blätter; *Crataegus*, Blätter; *Anthemis austriaca*, Blätter; *Cynara cardunculus*, Blätter; *Hyoscyamus niger*, Blätter; *Datura stramonium*, Blätter; *Hydrangea hortensis*, Blüten, Blätter.

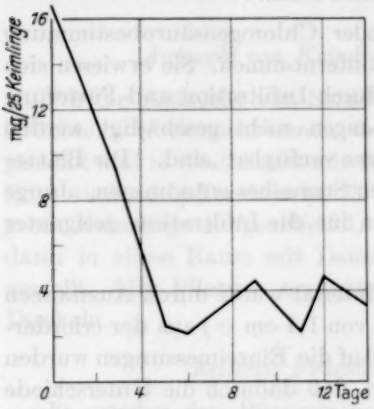


Abb. 2. Chlorogensäuregehalt in etiolierten Keimlingen von *Helianthus annuus*. 23° C.

Als günstigste Pflanzen erwiesen sich *Helianthus annuus* und *Hedera helix*. Wir verwendeten Keimlinge und Früchte von Sonnenblumen. Die Samen von Sonnenblumen enthalten 1% ihres Lufttrockengewichtes Chlorogensäure. *Hedera helix* war gut brauchbar für unsere Versuche mit Blättern. Die Menge der Chlorogensäure schwankt in den Blättern zwischen 7,0—10 mg/g Frischgewicht. Die Efeusproßachse enthält etwa 2,5 mg/g Frischgewicht; in der Wurzel konnten nur geringe Mengen nachgewiesen werden.

2. Verhalten von Chlorogensäure während der Dunkelkeimung von Helianthus annuus.

Aus einer Aufzucht von Sonnenblumenkeimlingen wurden in verschiedenen Altersstufen Proben von 25 gleichgroßen Keimlingen auf ihren Chlorogensäuregehalt untersucht. Mit zunehmendem Alter nimmt die Chlorogensäurekonzentration in den Keimlingen ab. Nach 3 Tagen ist nur noch die Hälfte des Ausgangsgehaltes nachweisbar, nach 5 Tagen ist bereits der unterste Wert von 2,5 mg/25 Keimlinge erreicht (s. Abb. 2).

Die Kurve zeigt Durchschnittswerte von mehreren Messungen. Die Keimlinge waren bei Beendigung des Versuches turgeszent und nicht geschädigt. Sie ergrünten vollständig, wenn sie nach 9tägiger Dunkelperiode in Dauerlicht gestellt wurden. Die ergrünten Pflanzen bildeten jedoch keine neue Chlorogensäure, wie eine Aufarbeitung nach 4 Tagen

Dauerlichtbehandlung zeigte. Die Abnahme der Chlorogensäure ist also nicht die Folge eines im Dunkeln auftretenden Hungerzustandes der Keimlinge. Die Oszillationen der Kurve zwischen dem 6. und dem 14. Tag beruhen aller Wahrscheinlichkeit nach auf der Ungleichheit der Keimlinge in Größe und Gewicht, die trotz Auslese der Früchte nicht zu vermeiden war.

Der Versuch, in den Keimlingen die Spaltprodukte von Chlorogensäure, Kaffeesäure oder Chinasäure, die bei einer eventuellen Hydrolyse entstanden sein könnten, nachzuweisen, mißlang. Parallel zur Abnahme der Chlorogensäure konnte eine Zunahme von drei charakteristisch gelb fluoreszierenden Substanzen auf dem Papierchromatogramm beobachtet werden. Die Rf-Werte dieser Stoffe sind:

0,29 mit $FeCl_3$ graubraun
0,25 „ „ graugrün
0,22 „ „ graugrün.

Bei Bedampfung mit konz. Ammoniak tritt eine starke Gelbfärbung dieser Verbindungen auf. Diese Farbintensivierung scheint uns ein Hinweis für die Flavonnatur dieser Substanzen zu sein. Der Gehalt der Keimlinge an Flavonen ist ohnehin sehr groß, wie eine starke Gelbfärbung des wäßrigen Extraktes nach Zusatz von NH_3 zeigt.

3. Bildung von Chlorogensäure während der Fruchtreife von Helianthus annuus.

Kurz nach der Befruchtung der Blütenstände von Sonnenblumen wurden bis zur Ausreifung in 10tägigem Abstand Proben von jeweils 50 (später 25) Früchten entnommen und zur Atmungsmessung, Chlorogensäure- und Fettbestimmung verwendet. Die Versuche fanden im September und Oktober 1954 statt. Ein qualitativer Vorversuch zeigte, daß sowohl in den Samen wie auch in den Fruchtschalen Chlorogensäure enthalten ist. Die Fruchtschalen enthalten jedoch bedeutend weniger Chlorogensäure. Es wurden trotzdem die ganzen Früchte verarbeitet (s. Abb. 3 und 4).

Die Kurven zeigen Mittelwerte der Ergebnisse aus drei Versuchsreihen. Während der Reife von *Helianthus annuus*-Früchten werden Chlorogensäure und Fett neu gebildet. Beide Stoffe erreichen mit dem Endstadium der Ausreifung an der Pflanze ihre höchste Konzentration. Während die Fettbildung ziemlich kontinuierlich erfolgt, setzt die stärkste Chlorogensäurebildung erst gegen Ende der Reifezeit ein. Im Verlauf der Atmungskurve tritt der bei Reifung von fleischigen Früchten beobachtete Atmungsanstieg („climacteric rise") ein (vgl. Biale 1950). Der Atmungsanstieg erfolgt in den vorliegenden Versuchen im zeitlichen Mittel der Reife vor dem steilsten Anstieg der Chlorogensäureproduktion.

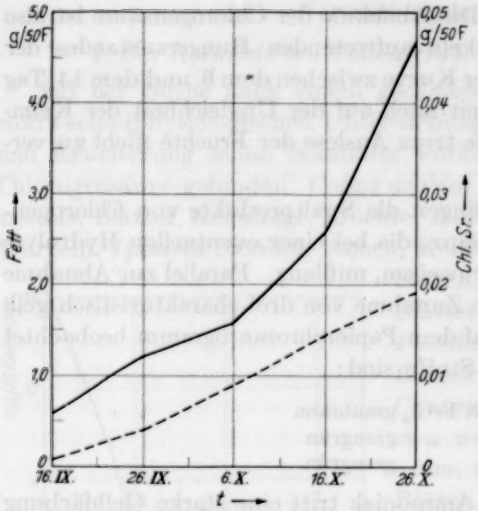


Abb. 3. Chlorogensäuregehalt und Fettgehalt während der Reife von *Helianthus annuus*-Früchten. ——— Chlorogensäure. – – – Fettgehalt. Ordinate: Konz. g/50 Früchte. Abszisse: Zeit.

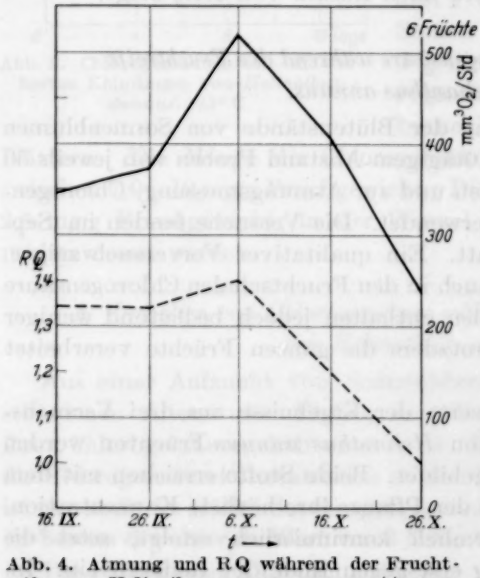


Abb. 4. Atmung und RQ während der Fruchtreife von *Helianthus annuus*. ——— Atmung. – – – RQ. Ordinate: mm³ O_2/Stunde/6 Früchte. Abszisse: Zeit.

Gegen Ende der Reife fällt die Atmung ziemlich steil ab. Da die Atmung nur an den entsprechenden Versuchstagen (im Abstand von 10 Tagen) gemessen wurde, entspricht die Kurve wahrscheinlich nicht genau dem Verlauf der Atmung in der gesamten Zeit. Außerdem stellen diese Kurven keine allgemeingültige zeitliche Beziehung für die Fruchtreife von *Helianthus annuus* dar, da die Pflanzen im Freiland standen und den klimatischen Bedingungen unterworfen waren. Der RQ lag während der Reifezeit bei jeder Messung über der Einheit. Im Climacterium steigt er bis auf 1,4 an. Da Samen von Sonnenblumen als Reservestoff fast ausschließlich Öl enthalten, dessen Bildung aus Kohlenhydraten summarisch ein Reduktionsvorgang ist, läßt sich der hohe RQ in diesen Versuchen auf diese Erscheinung zurückführen (vgl. PAECH 1950).

Die drei Kurvenbilder, aus denen sich vorstehende Kurven als Mittel ergeben haben, zeigen im einzelnen einen verschiedenen Verlauf. Allen gemeinsam ist jedoch die Erscheinung, daß Fett- und Chlorogensäurebildung anfänglich parallel ansteigen und erst gegen Ende der Reifezeit in ihrem Kurvenverlauf auseinanderweichen. Während zu Beginn der Reifung bei einer Fettbildung von 0,5 g/50 Früchte gleichzeitig 6,5 mg/50 Früchte Chlorogensäure

gebildet werden, ist das Verhältnis von Fettbildung zu Chlorogensäure gegen Ende der Reife 0,5 g : 21 mg/50 Früchte. Der RQ liegt in allen drei Kurvenbildern über 1,0, steigt an bis zu einem Maximum und fällt gegen Ende der Reifung genau wie die Atmung ab.

Es scheint hier kein direkter Zusammenhang zwischen RQ und Verlauf der Fettbildung zu bestehen. Man kann jedoch annehmen, daß der RQ, der zu Beginn der Fruchtreife direkt Ausdruck der Fettbildung ist, später durch die Atmung während anderer Synthesen beeinflußt wird.

4. Untersuchungen zur Bildung von Chlorogensäure in grünen Blättern.

a) Die Wirkung von Zuckerfütterung auf die Chlorogensäuresynthese.

Die Förderung der Synthese einiger Pflanzenstoffe durch Zuckerfütterung wurde für Anthocyane von Overton (1899), Blank (1951), Thimann, Edmondson und Radner (1951), Eberhardt (1954) und für das Arbutin von Danner (1940) nachgewiesen. So lag es nahe, auch für die Synthese von Chlorogensäure die Wirkung von künstlich zugeführtem Zucker zu untersuchen. Wir infiltrierten statt Glucose Rohrzucker, um bei gleicher Molarität die doppelte Menge Zucker an die Zellen heranzubringen. Außerdem wird wahrscheinlich bei der jetzt angenommenen Spaltung des Rohrzuckers durch eine Rohrzuckerphosphorylase ein anorganisches Phosphat aufgenommen und damit beim Rohrzuckerabbau eine energiereiche Phosphatbindung eingespart. Es wurden Blätter von *Coffea arabica*, *Ipomoea coccinea* und *Hedera helix* verwendet.

Die Kaffeeblätter stammten von einem Strauch aus dem Gewächshaus des Botanischen Gartens in Tübingen. Sie wurden in zwei Hälften geteilt und die Mittelrippe entfernt. Die eine Hälfte wurde mit Aqua dest., die andere mit einer 0,1 mol Rohrzuckerlösung infiltriert. Nach dem völligen Ausdunsten wurden die Blatthälften sechs Tage auf den entsprechenden Lösungen belassen. Vor dem Versuch wurde das jeweilige Frischgewicht bestimmt.

Es fand eine Neubildung von Chlorogensäure statt.

Wasserkontrolle	7,5 mg/g Frischgewicht
0,1 mol Rohrzucker	9,5 mg/g Frischgewicht

Die übrigen Versuche ergaben ähnliche Werte. Diese Resultate waren nicht überzeugend, es wurde deshalb nach anderen Versuchsobjekten Ausschau gehalten.

Blätter von *Ipomoea coccinea* reagierten ebenfalls mit einer Steigerung des Chlorogensäuregehaltes auf Zuckerfütterung, sie waren jedoch für die Infiltrationsmethode wegen ihrer empfindlichen Epidermis schlecht zu verwenden.

Dagegen erwiesen sich Blätter von *Hedera helix* als geeignet. Infiltration und anschließende Fütterung mit 0,1 mol Rohrzuckerlösung

bewirkten eine deutliche Zunahme des Chlorogensäuregehaltes gegenüber der Wasserkontrolle (s. Abb. 5). Die Kurve zeigt den Anstieg des Chlorogensäuregehaltes im Verlauf eines 8tägigen Versuches. Die Werte sind Mittel aus mindestens vier Bestimmungen. Die Wasserkontrolle bleibt relativ konstant auf niedrigem Niveau.

Parallele Atmungsmessungen zeigen einen Anstieg der Atmung bis zum 4. Tag, auf den ein Abfall folgt. Die Atmung konnte nur bis zum 5. Tag verfolgt werden, da die Blattstücke durch ein häufiges Umsetzen in die Warburggefäße geschädigt wurden. Hierauf ist auch eventuell der Abfall der Atmung nach dem 4. Tag zurückzuführen. Die Atmung der Wasserkontrolle schwankt um einen niedrigen Wert (s. Abb. 6).

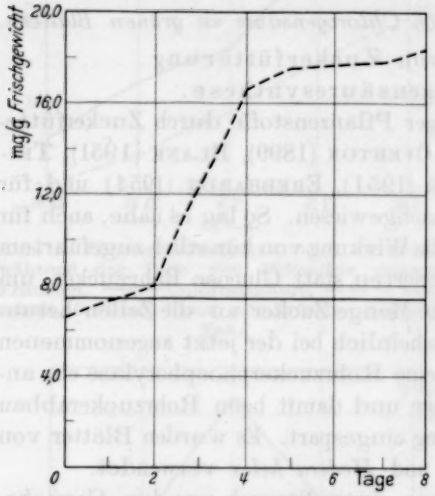


Abb. 5. Chlorogensäuregehalt bei Fütterung von 0,1 mol Rohrzucker *Hedera helix*, mg/g Frischgewicht. ——— Wasserkontrolle. – – – Zukkerfütterung. 20° C.

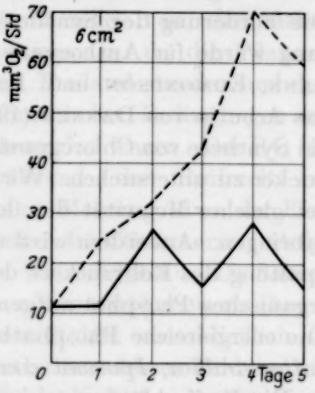


Abb. 6. Atmung von *Hedera helix*-Blattstücken bei Zuckerfütterung. ——— Wasserkontrolle. – – – Zukkerfütterung mg³ O_2/Stunde/6 cm². 22° C.

Die beschriebenen Versuche wurden alle in einem temperaturkonstanten Raum mit 12stündigem Licht-Dunkel-Wechsel durchgeführt.

Tabelle 2. *Chlorogensäuregehalt in Hedera helix-Blattstücken nach Zuckerfütterung.* Versuchsdauer: 4 Tage, 20° C.

	Dunkel	Licht
Wasserkontrolle . .	9,5 mg/gF	
0,1 mol Rohrzucker	12,0 mg/gF	
0,1 mol Rohrzucker		16,6 mg/gF

Parallele Versuche, die in vollständigem Dunkel durchgeführt wurden, zeigten, daß die Bildung von Chlorogensäure auf Zucker im Dunkeln entweder ganz ausbleibt oder doch nur sehr gering ist.

Andere Versuche zeigten keine Steigerung gegenüber der Wasserkontrolle im Dunkeln. Somit scheint das Licht eine Wirkung auf die

Synthese der Chlorogensäure zu haben, wie auch schon für die Bildung von Anthocyanen aus Zucker festgestellt wurde (EBERHARDT 1954).

Bei unseren Fütterungsversuchen mit Rohrzucker konnten wir in den meisten Fällen eine Bildung von Anthocyan in den Efeublättern beobachten. Wir benutzten diese Feststellung ohne quantitative Auswertung als Hinweis darauf, daß die mit Zucker infiltrierten Blattstücke den Versuch ungeschädigt überstanden hatten.

b) Einfluß von anderen Verbindungen auf die Chlorogensäuresynthese.

Zur Untersuchung der Entstehung von Chlorogensäure sind folgende Tatsachen wichtig:

1. Chlorogensäure bildet sich aus zwei Komponenten, der Chinasäure und der Kaffeesäure, die aller Wahrscheinlichkeit nach als fertige Moleküle anfallen und sich dann esterartig miteinander verbinden.

2. Chlorogensäure wird, wie nachgewiesen wurde, bei Zufuhr von Zucker vermehrt gebildet.

Es erhebt sich nun die Frage: werden beide Komponenten gleichzeitig aus Zucker gebildet oder entsteht nur eine, die sich dann mit dem schon vorhandenen Partner zum Depsid zusammenfügt? Hierzu können folgende Versuche einen Beitrag leisten.

α) Fütterung von Kaffeesäure + Rohrzucker.

β) Fütterung von Chinasäure + Rohrzucker.

α) Da uns keine Kaffeesäure zur Verfügung stand, haben wir statt dieser Tyrosin verwendet.

Das Tyrosinmolekül ist dem der Kaffeesäure ähnlich; auch hier liegt ein Phenyl-Propangerüst vor. Theoretisch wäre eine Bildung von Kaffeesäure aus Tyrosin nach Einführung einer Hydroxylgruppe in den Phenolring denkbar.

Efeublätter und Kaffeeblätter wurden mit einer Lösung, in der 0,1 mol Rohrzucker + 0,1% Tyrosin enthalten war, infiltriert und 4 Tage lang gefüttert.

Die Ergebnisse zeigen bei beiden Versuchen keinerlei Effekt des Tyrosins auf die Chlorogensäurebildung; damit ist auch eine Bildung von Kaffeesäure, die ebenfalls nicht nachgewiesen werden konnte, fraglich (vgl. DANNER 1940, der zu demselben Ergebnis für Arbutin kam).

Versuche mit Kaffeeblättern brachten das gleiche Ergebnis. Warum in den Versuchen mit Tyrosinfütterung der gleichzeitig zugesetzte Zucker nicht für die Chlorogensäuresynthese verwendet wurde, ist ungeklärt; ebenso, ob das Tyrosin vollständig in die Blätter eindringen konnte. Eine Einführung einer Hydroxylgruppe an Benzolkerne findet in der lebenden Zelle sehr häufig statt. Tyrosin ist hierfür besonders

Tabelle 3. *Chlorogensäuregehalt in Blattstücken von Hedera helix nach Fütterung von Rohrzucker + Tyrosin.*
Versuchsdauer: 4 Tage; 20° C.

1. Versuch:	Wasserkontrolle	11,5 mg/g	Frischgewicht
	0,1 mol Rohrzucker	17,5 „	„
2. Versuch:	Wasserkontrolle	6,0 „	„
	0,1% Tyrosin + 0,1 mol Rohrzucker	5,5 „	„
3. Versuch:	Wasserkontrolle	9,0 „	„
	0,1% Tyrosin + 0,1 mol Rohrzucker	9,5 „	„

bekannt. Da aber ein Übergang von Tyrosin in Kaffeesäure nicht stattzufinden scheint, halte ich es eher für möglich, daß beide Moleküle, Kaffeesäure und Tyrosin, einen gemeinsamen Ursprung haben, ihre Bildungswege sich aber schon früher trennen.

Für eine solche Auffassung gibt auch EHRENSVÄRD (1954) Hinweise, der eine Bildung von Aromaten des Tyrosintyps aus Glucosefragmenten über Dehydrochinasäure → Dehydroshikimisäure → Shikimisäure als möglichen Weg angibt.

β) Chinasäure wurde als 0,1 mol-Lösung (mit NH_3 auf p_H 5,0 gebracht) in Efeublätter infiltriert. Da nach 24 Stunden die Blattstücke stark gebräunte Ränder zeigten, was ein sicheres Zeichen für Schädigung ist, schien eine Fortführung dieser Versuche sinnlos.

DANNER (1940) machte mit Chinasäurefütterung an Blätter von *Saxifraga crassifolia* die gleichen Erfahrungen.

c) Untersuchung zuckerähnlicher Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Biosynthese der Chlorogensäure.

α) Mannit. Fütterung von 0,2 mol Mannit an Efeublattstücke hatte keinerlei steigernde Wirkung auf den Chlorogensäuregehalt der Blätter.

Das gleiche Ergebnis war bei der Anthocyanbildung in Blättern von *Saxifraga crassifolia* festgestellt worden (EBERHARDT 1954). Auch beim Efeu war mit Mannit keine Anthocyanbildung zu beobachten.

β) Inosit. Durch Fütterung von 0,2 mol Inositlösung konnte keine Neubildung von Chlorogensäure in Efeublattstücke ausgelöst werden. Es wurde eine geringe Bildung von Anthocyan beobachtet (vgl. THIMANN, EDMONDSON und RADNER 1951).

d) Die Wirkung von Inhibitoren des Kohlenhydratabbaues auf die Bildung von Chlorogensäure aus Zucker.

Um den Bildungsweg von Chlorogensäure aus Zucker näher aufzuklären, war unser Interesse auf zwei Hauptfragen gerichtet:

1. Werden der aromatische und der alicyclische Ring der Chlorogensäure (Kaffeesäure und Chinasäure) durch direkte Cyclisierung der Glucose gebildet, oder entstehen diese aus Fragmenten des Kohlenhydratabbaues?

2. Sind für die Biosynthese der Chlorogensäure energieliefernde Prozesse erforderlich?

Die Entstehung eines aromatischen Ringes aus dem intakten Glucosemolekül scheint nach neueren Untersuchungen an Mikroorganismen ziemlich ausgeschlossen zu sein. GILVARG und BLOCH (1952) führten an Saccharomyces Fütterungsversuche mit C^1-markierter Glucose durch und fanden in der isolierten aromatischen Aminosäure Phenylalanin im Benzolkern eine Radioaktivität in den C^2- und C^6-Atomen. Das gleiche fanden auch SHIGEURA und Mitarbeiter (1953) und SREENIVASAN (1954) für die Bildung von Shikimisäure und Tyrosin.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß Glucose eventuell bis zu 3 C-Bruchstücken aufgespalten wird. Diese fügen sich wahrscheinlich mit 4 C-Verbindungen zusammen zu einem 7 C-Körper, der den Ringschluß zum Benzolkern mit einem anhängenden C-Atom vollführt. Auf diesem Wege könnte die Reihe Dehydrochinasäure → Shikimisäure → Aromaten aus solchen Vorstufen entstehen.

Unsere eigenen Versuche beschränkten sich im wesentlichen auf die Untersuchung der Wirkung von spezifischen Fermentgiften auf den Kohlenhydratabbau und damit auf die Bildung von Chlorogensäure aus Zucker.

a) Die Wirkung von Fluor-Ionen. Nach WARBURG und CHRISTIAN (1942) hemmt NaF bei Hefe die Enolase, ein Mg-Proteid, das den Übergang von 2-ph-Glycerinsäure in 2-ph-Brenztraubensäure katalysiert. Es bildet sich ein komplexes Mg-Fluorphosphat. Wir infiltrierten in Efeublattstücke eine Lösung von 10^{-2} mol NaF + 0,1 mol Rohrzucker. Wurden die Blattstücke sofort mit dieser kombinierten Lösung infiltriert, so waren sie bereits nach 2 Tagen, bei einer Konzentration von 5×10^{-3} mol NaF nach 4 Tagen geschädigt. Um diese Schädigung zu vermeiden, wurden die Blätter zuerst mit 0,1 mol Rohrzuckerlösung infiltriert und 2 Tage auf der Zuckerlösung belassen. Dann wurden sie mit Aqua dest. abgespült und anschließend mit Konzentrationen von 10^{-3} mol bzw. 5×10^{-3} mol NaF infiltriert und auf eine Lösung von NaF + Zucker gelegt. Ob die stattfindende Hemmung mit Na-Fluorid in die Synthese des Gesamtmoleküls eingreift oder ob die Bildung von Vorstufen möglich ist, aber die letzten Schritte der Biosynthese verhindert werden, läßt sich mit Hilfe dieser Versuche natürlich nicht nachweisen.

Es findet gegenüber der Zuckerkontrolle bei Hemmung durch NaF keine Neubildung von Chlorogensäure statt.

Tabelle 4. *Chlorogensäuregehalt in Blattstücken von Hedera helix nach Fütterung von NaF + Rohrzucker.*
Konz. mg/g Frischgewicht. Rz = Rohrzucker. Temperatur 20° C.

Versuch	Konzentrationen der infiltrierten Lösung	Chlorogensäuregehalt
1.	4 Tage 0,1 mol Rz	15,7
	4 Tage Wasserkontrolle	8,8
2.	2 Tage 0,1 mol Rz anschließend 2 Tage Rz + 10^{-2} mol NaF	geschädigt
3.	2 Tage 0,1 mol Rz anschließend 2 Tage Rz + 5×10^{-3} mol NaF	9,3
4.	2 Tage 0,1 mol Rz anschließend 2 Tage Rz + 10^{-3} mol NaF	11,6
5.	2 Tage 0,1 mol Rz	10,0

Demnach erscheint eine Bildung von Chlorogensäure durch unmittelbaren Ringschluß nicht stattzufinden. Auch die Anthocyansynthese unterblieb im Gegensatz zu den Zuckerkontrollen.

b) Die Wirkung von Fluoressigsäure. Nach bisher vorliegenden Untersuchungen über die Hemmung des Zuckerabbaues durch Fluoressigsäure scheint es sich hierbei um eine Substratverdrängungsreaktion zu handeln. Fluoressigsäure verbindet sich mit der den Zitronensäurezyklus einleitenden Oxalessigsäure zu Fluorzitrat (ELLIOT und KALNITZKY 1950). Die sonst in diese Reaktion eintretende „aktivierte" Essigsäure wird blockiert. Man findet daher eine Anhäufung von Pyruvat und Azetat. Das gebildete Fluorzitrat wird nicht weiter oxydiert. Für diese Versuche, die an Nierengewebe durchgeführt wurden, sind Konzentrationen von 10^{-3} mol Fluorazetat angewendet worden.

Für eigene Versuche an Blattstücken von *Hedera helix* wurde das Na-Salz der Fluoressigsäure in folgenden Konzentrationen verwendet.

Konzentrationen $> 10^{-3}$ mol wurden weder während viertägiger noch zweitägiger Versuchsdauer vertragen. Konzentrationen von 10^{-3} mol und darunter konnten bei beiden Methoden angewendet werden. Die Tabelle zeigt, daß Fluoressigsäure in Konzentrationen, die die Blätter nicht schädigen, in keinem Fall die Chlorogensäuresynthese hemmte. Die bei Zuckerfütterung beobachtete Anthocyansynthese trat jedoch bei den mit Fluoressigsäure infiltrierten Blattstücken nicht auf. Dieser Befund spricht für eine Beteiligung des Zitronensäurezyklus bei der Anthocyansynthese. Für Chlorogensäurebildung scheint die Abzweigungsstelle im glykolytischen Abbau, also vor dem Zitronensäurezyklus, zu liegen. Nach den oben beschriebenen Wirkungen des NaF kommen wahrscheinlich 2-ph-Enolbrenztraubensäure, Brenztraubensäure und Azetat als Ausgangssubstanzen für die Biosynthese der Chlorogensäure in Frage.

Um die Wirkung von Azetat bei gleichzeitiger Hemmung durch Fluoressigsäure zu untersuchen, wurde 0,1 mol Kaliumazetat statt

Tabelle 5. *Chlorogensäuregehalt nach Fütterung von Fluorazetat + Rohrzucker an Blattstücke von Hedera helix.*
Versuchsdauer: 4 Tage; mg/g Frischgewicht; Rz = Rohrzucker; F = Fluorazetat.

	Versuche	Gehalt an Chlorogensäure bei Versuchsende	Bildung von Anthocyan
1.	5×10^{-3} mol F + Rz (0,1 mol)	geschädigt	
2.	4×10^{-3} mol F + Rz (0,1 mol)	geschädigt	
3.	2 Tage 0,1 mol Rz 2 Tage 4×10^{-3} mol F + Rz	geschädigt	
4.	2 Tage 0,1 mol Rz 2 Tage 2×10^{-3} mol F + Rz	geschädigt	
5.	0,1 mol Rz	13,9	+
	0,1 mol Rz + 10^{-3} mol F	19,8	—
	Wasserkontrolle	7,1	—
6.	0,1 mol Rz	17,3	+
	2 Tage 0,1 mol Rz 2 Tage 10^{-3} mol F + Rz	19,8	—
7.	Wasserkontrolle	10,0	—
	0,1 mol Rz	17,2	+
	2 Tage 0,1 mol Rz 2 Tage 5×10^{-4} mol F + Rz	15,8	—

Zucker zugesetzt. Die Konzentration entspricht nur $^1/_6$ der sonst angewendeten Zuckerkonzentration in bezug auf die C-Atome, die enthalten sind. Höhere Azetatkonzentrationen wurden nicht vertragen.

Tabelle 6. *Fütterung von Azetat + Fluoressigsäure an Hedera helix-Blattstücke.*
Versuchsdauer: 4 Tage; Chlorogensäuregehalt: mg/g Frischgewicht.
Rz = Rohrzucker; F = Fluoressigsäure. 20° C.

	Versuche	Chlorogensäuregehalt
1.	Wasserkontrolle	4,4
	10^{-3} F + 0,1 mol Rz	14,2
	10^{-3} mol F + 0,1 mol K-Azetat	4,6
2.	Wasserkontrolle	8,85
	0,1 mol Rz	15,2
	10^{-3} mol F + 0,1 mol Rz	19,1

Azetat wirkt bei gleichzeitiger Fluoressigsäurehemmung nicht fördernd auf die Chlorogensäurebildung. Diese Erscheinung beweist nicht, daß die Abzweigung der Chlorogensäuresynthese nicht beim Azetat liegen kann. Das Ergebnis ist eher ein Zeichen dafür, daß das zugesetzte Azetat nicht wie das in der Glykolyse anfallende in energiereicher Bindung, als Acetyl-Co-A gebunden ist. Dieses Ergebnis zeigt, daß man aus derartigen Fütterungsversuchen keine Antwort auf die Frage nach den für die Chlorogensäurebildung wichtigen Zwischenprodukten erhält.

c) Die Wirkung von Chloroform. Da nach WARBURG (1948) die Wirkung des Chloroforms in einer Drosselung der Atmung und damit des Zitronensäurezyklus bestehen soll, schien dessen Anwendung zur Be-

stätigung der vorigen Versuchsergebnisse gerechtfertigt. Die Glykolyse müßte demnach normal ablaufen können, während der Zitronensäurezyklus gehemmt ist.

Methode: In 1-Liter-Rillenweckgläser wurden 100 ml der Versuchslösung gefüllt; auf dieser schwammen die infiltrierten Blattstücke. Die Rille, die den Deckelrand aufnimmt, wurde mit Wasser gefüllt; auf einen Wattebausch, der innen am Deckel befestigt war, wurde Chloroform gegeben und das Glas schnell verschlossen. Da Chloroform sich in Wasser kaum löst, konnte es nicht entweichen und die Chloroformkonzentration im Glas als konstant angenommen werden.

Die Versuche liefen über einen Zeitraum von 4 Tagen, am 2. und 3. Tag wurde Chloroform gegeben. Gaben von $>$ 0,1 ml Chloroform/Liter wirkten schädigend und hatten eine Bräunung der Blätter zur Folge. Als besonders günstig erwies sich folgender Ansatz:

1. Tag Infiltration von 0,1 mol Rohrzucker, Ausdunsten, anschließend auf Lösung.
2. Tag 0,07 ml Chloroform.
3. Tag 0,05 ml Chloroform.
4. Tag Aufarbeitung.

Mit dieser Methode erhielten wir die in der Tabelle zusammengestellten Ergebnisse.

Tabelle 7. *Chlorogensäuregehalt in Hedera helix nach Zuckerfütterung und Chloroformnarkose.*

Konz.: mg/g Frischgewicht; Versuchsdauer: 4 Tage. Rz = Rohrzucker; 20° C.

1. Wasserkontrolle	8,6
0,1 mol Rz + $CHCl_3$	17,6
2. Wasserkontrolle	8,5
0,1 mol Rz + $CHCl_3$	14,7
3. Wasserkontrolle	8,0
0,1 mol Rz + $CHCl_3$	15,5

Bei allen Versuchen war am Ende der 4 Tage Chloroform noch durch Geruch wahrnehmbar.

Trotz Chloroformnarkose findet Chlorogensäuresynthese statt, und zwar in demselben Maße, wie bei der gewöhnlichen Zuckerfütterung. Eine Schädigung trat bei diesen geringen Konzentrationen nicht auf. Die Blätter waren während der ganzen Dauer des Versuches turgeszent. Nimmt man an, daß die spezifische Chloroformwirkung in einem Eingriff in die Atmungskette besteht, während Dehydrierungen der Substrate durch DPN normal ablaufen, erhebt sich die Frage nach dem Verbleib des Wasserstoffs, der nicht durch den Sauerstoff aufgenommen werden kann. Diese Frage wird später erörtert werden.

Eine Anthocyansynthese konnte auch bei diesen Versuchen nicht beobachtet werden.

d) Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol (DNP). Wie die bisher geschilderten Versuche zeigten, führt eine Trennung des Zitronensäurezyklus von der Glykolyse zu einer Anhäufung von Spaltprodukten, die zu einer Steigerung des Chlorogensäuregehaltes führen können. Es bleibt zu prüfen, ob die Ableitung dieser „gestauten" Spaltprodukte in den Kanal der Chlorogensäuresynthese zusätzlicher Energiezufuhr bedarf. Als Energielieferant für derartige Synthesen gilt heute allgemein ATP. Nach Lipmann und Kaplan (1949), Kandler (1950) hemmt 2,4-Dinitrophenol den Aufbau von energiereichen Phosphatbindungen und entkoppelt damit Dehydrierungs- von Phosphorylierungsvorgängen. Bonner und Millerd (1953) stellten an Mitochondrien von *Phaseolus aureus* fest, daß DNP die oxydative Bildung von ATP hemmt. DNP hemmt jedoch nur die Atmungskettenphosphorylierung, während die Substratphosphorylierungen ungehindert weitergehen. Die bei der Substratphosphorylierung entstehenden energiereichen Phosphatbindungen kommen gegenüber den bei der Atmung gebildeten für den hohen Energiebedarf der Synthesen mengenmäßig kaum in Betracht. Die beim Zuckerabbau anfallenden Spaltprodukte werden bei DNP-Einwirkung ohne Verwertung veratmet und bewirken eine sofort einsetzende Atmungssteigerung. Die hemmende Wirkung von bestimmten Konzentrationen von DNP auf die Bildung von Anthocyanen und Carotinoiden in höheren Pflanzen ist bekannt (Stadler 1942, Eberhardt 1954, Beekmann 1954).

An Blattstücken von *Hedera helix* wurden Infiltrationsversuche mit verschiedenen Konzentrationen DNP durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei Konzentrationen über 5×10^{-5} mol DNP die Chlorogensäurebildung aus Zucker gehemmt wird. 10^{-5} mol DNP wirkt nicht mehr hemmend, es tritt auch Anthocyanbildung auf. Diese Versuche liefern einen Hinweis dafür, daß für die Synthese von Chlorogensäure energiereiche Phosphatbindungen benötigt werden.

Tabelle 8. *Chlorogensäuregehalt in Blättern von Hedera helix nach Zuckerfütterung und DNP-Einwirkung.*
Gehalt in mg/g Frischgewicht; Rz = Rohrzucker; Dauer: 4 Tage.

	Versuche	Chlorogensäuregehalt	Anthocyanbildung
1.	0,1 mol Rz + 10^{-4} mol DNP	geschädigt	
2.	Wasserkontrolle	7,6	—
	0,1 mol Rz	14,5	+
	7×10^{-5} DNP + 0,1 Rz	7,6	—
	7×10^{-5} DNP + 0,1 mol Rz	7,6	—
3.	Wasserkontrolle	8,5	—
	0,1 mol Rz	15,6	+
	10^{-5} mol DNP + 0,1 mol Rz	13,6	+

5. Charakterisierung einer in Blättern von Hedera helix gefundenen Substanz.

Bei Versuchen zur papierchromatographischen Bestimmung der Chlorogensäure aus Efeublättern trat auf dem Papier regelmäßig eine fluoreszierende Verbindung mit dem Rf-Wert 0,83—0,84 auf. Sie zeigte blaue Fluoreszenz, die bei Bedampfung mit konzentriertem Ammoniak in grüngelb umschlägt. Besprühen mit alkoholischer $FeCl^3$-Lösung ergab grüne Färbung des Fleckens. Alle Nachweisreaktionen sowie das Absorptionsspektrum entsprachen genau den für Chlorogensäure gefundenen Werten (s. Abb. 7 und Tabelle 9).

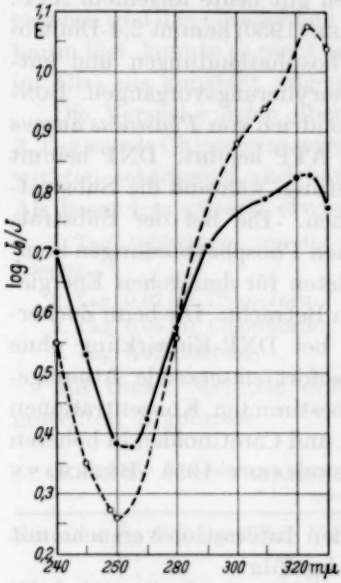


Abb. 7. Absorptionskurve von Substanz X aus *Hedera helix*: ———; Chlorogensäure (rein): — — —.

Zur Hydrolyse wurde der äthylalkoholische Efeuextrakt mit Hilfe eines dicken Papiers (Schleicher-Schüll Nr. 2071) im Bu-Eisessig + Wasser-Gemisch aufgetrennt, der Streifen mit der Substanz X herausgeschnitten und mit 70%igem Äthylalkohol ausgelaugt. Nach dem Eingen dieses Auszuges wurde mit 5% KOH hydrolysiert und mit verdünnter Schwefelsäure wieder neutralisiert. Zur Identifizierung der bei der Hydrolyse entstandenen Substanzen ließen wir den Extrakt noch einmal auf dünnem Papier laufen (Schleicher-Schüll Nr. 2045). Der Nachweis von Kaffeesäure gelang sowohl in Bu-Eisessig als auch in Eisessig-Wasser. Eine nähere Identifizierung konnte noch nicht vorgenommen

Tabelle 9.
Die Konzentrationen der beiden Stoffe waren bei den Absorptionsmessungen verschieden hoch.

Substanz	Rf Bu: Eisessig	Rf Ess.: Wasser	Fluoreszenz	
			unmittelbar	+ NH_3
Chlorogensäure . .	0,73	0,75—0,79	blau	grüngelb
Substanz X . . .	0,82—0,84	0,57—0,60	blau	grüngelb

Substanz	$FeCl_3$	Höpfner	Hydrolyse mit KOH
Chlorogenaäure . .	grün	gelb	Kaffeesäure
Substanz X . . .	grün	gelb	Kaffeesäure

werden. Diese Befunde lassen jedoch auf eine enge Verwandte, wenn nicht sogar eine Isoform der Chlorogensäure schließen. Barnes, Feldmann und White (1950) haben in grünen Kaffeebohnen eine Isochlorogensäure gefunden. Corse (1953) isolierte aus Pfirsichen eine Neochlorogensäure, die verschieden von Isochlorogensäure sein soll. Beide Säuren zeigen die gleichen chemischen Reaktionen sowie gleiches UV-Spektrum wie Chlorogensäure. Verfasser geben keine Rf-Werte an. Durch die Tatsache, daß Chinasäure zwei zur Carboxylgruppe symmetrisch gelegene Hydroxylgruppen besitzt, die mit Kaffeesäure verestert werden können, ist das Auftreten von Isoformen leicht zu erklären. Die gefundene Substanz ist in geringerer Konzentration in Efeublättern enthalten als Chlorogensäure. Sie verhält sich jedoch bei allen oben beschriebenen Versuchen wie diese. Bei Zuckerfütterung nimmt sie zu. Von einer Isolierung wurde noch abgesehen, sie wäre für weitere Untersuchungen an diesem Objekt unumgänglich.

Diskussion.

Die Versuche zum Abbau und Aufbau der Chlorogensäure in *Helianthus annuus* zeigen, daß das Depsid, das zwar auch in den Blättern der Sonnenblumen synthetisiert wird, doch einen wesentlichen Anteil nur an der Zusammensetzung des Samens hat. Sie wird im Laufe der synthetischen Vorgänge während der Samenbildung aufgebaut und verschwindet wieder im Verlauf der hydrolytischen Prozesse während der Samenkeimung. Ihr Verbleib bei diesem Abbau konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es bestehen mehrere Möglichkeiten: entweder sie wird wie das Reservefett aufgespalten und teilweise veratmet, oder ihre hydrolytischen Spaltprodukte, Kaffeesäure und Chinasäure, werden zum Aufbau anderer Stoffe verwendet. Der Gedanke an einen Einbau der Kaffeesäure in das Flavongerüst liegt nahe. Beide enthalten in ihrem Molekül ein Phenyl-Propangerüst. Sichere Beweise für eine Beteiligung der aus der Chlorogensäure stammenden Kaffeesäure bei der Bildung von Flavonen liegen nicht vor. Wir konnten weder Kaffeesäure noch Chinasäure in unserem Keimlingsextrakt nachweisen. Statt dessen traten jedoch in vermehrtem Umfang Stoffe mit Flavoncharakter auf, deren Herkunft bisher unbekannt ist.

Die Synthese von Chlorogensäure bei der Fruchtreife von Sonnenblumen setzt gleichzeitig mit der Ölbildung ein und erreicht zur gleichen Zeit wie diese ihren Höchstwert. Der Kurvenverlauf ist jedoch nicht in allen Teilen parallel. Während die Fettbildung kontinuierlich ihrem Endwert zustrebt, verläuft die Synthese von Chlorogensäure zuerst langsamer. Erst gegen Ende der Reifezeit der Früchte tritt ein steiler Anstieg der Kurve ein. Der Atmungsanstieg („climacteric rise") setzt vorher ein und erreicht vor der Phase der stärksten Chlorogensäurebildung sein

Maximum. Vermutlich werden während des Atmungsanstiegs im wesentlichen energiebedürftige Vorstufen der Chlorogensäure gebildet, deren weitere Verarbeitung auch während des Abfalls der Atmung ungehindert fortschreitet. Es ist jedoch zu beachten, daß der Atmungsanstieg Zeichen allgemein einsetzender Synthesen ist und wohl in der Hauptsache mit der Fettbildung in Zusammenhang steht, wie auch der stets über der Einheit liegende RQ beweist.

Nach HULME (1954) und PEARSON und ROBERTSON (1954) scheint der Quotient ATP/ADP beim Climacterium verkleinert, die Phosphorylierungskapazität und damit der oxydative Umsatz erhöht zu sein. Da auch in den hier vorliegenden Untersuchungen der Atmungsanstieg in eine Phase erhöhter Synthesen fällt, die energiereiche Phosphatbindungen benötigen, ist die Steigerung während der Fruchtreife durch einen erhöhten Verbrauch an ATP zu erklären (vgl. EBERHARDT 1955).

Der Abfall der Atmung gegen Ende der Reifung könnte auf den erschwerten Zutritt des Sauerstoffs, durch anatomische Veränderungen der Struktur bedingt, zurückzuführen sein (vgl. PAECH 1952). Sonnenblumenfrüchte erleiden durch starken Wasserverlust und Einlagerung von Fett besonders starke Veränderungen ihrer Struktur. Die Neubildung von Chlorogensäure aus Zucker schließt zwei Möglichkeiten der Beteiligung des Kohlenhydratstoffwechsels ein.

1. *Die Lieferung von Vorstufen aus Spaltprodukten der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus.*

2. *Die Erzeugung von energiereichen Phosphatbindungen durch einen intensivierten Stoffwechsel.*

Diesen Fragen begegnen wir bei der Aufklärung der Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe überall; nicht nur bei künstlicher Zuckerfütterung, sondern auch bei ihrer Entstehung während des normalen Stoffwechsels der Zelle. Die Intensivierung des Stoffwechsels von *Hedera helix* durch künstliche Zuckerfütterung wird durch den rasch einsetzenden Atmungsanstieg nach Infiltration einer 0,1 mol-Rohrzuckerlösung deutlich. Die Atmung steigt bis zum 4. Tag der Fütterung stetig an. Daß dieser Atmungsanstieg allein auf Chlorogensäurebildung zurückzuführen ist, ist wenig wahrscheinlich, weil Zuckerfütterung auch andere Synthesen (Anthocyan) auslöst. Die intensivste Chlorogensäurebildung erfolgt jedoch zwischen dem 2. und dem 4. Tag, also während der Phase der gesteigerten Atmung. Diese Erscheinung spricht für eine Beteiligung von energieliefernden Prozessen am Aufbau der Chlorogensäure. Eine solche Ansicht wird bestärkt durch unsere Versuche mit Dinitrophenol. DNP, das den Aufbau von ATP bei der Atmungskettenphosphorylierung hemmt, unterbindet auch die Synthese von Chlorogensäure aus Zucker in Efeublättern.

Die Möglichkeit aromatischer Synthesen aus dem intakten Glucosemolekül, wie sie noch von H. O. L. Fischer (1945), Dangschat und Fischer (1950), aber auch von Kurssanow (1950) angenommen werden als Weg über Glucose-6-phosphat und m-Inositphosphat, ist vielfach diskutiert (Geissmann 1952) und abgelehnt worden (Ehrensvärd 1954). Auch nach unseren Versuchen, mit Anwendung spezifischer Eingriffe in den Kohlenhydratabbau, scheint dieser Bildungsweg ausgeschlossen zu sein.

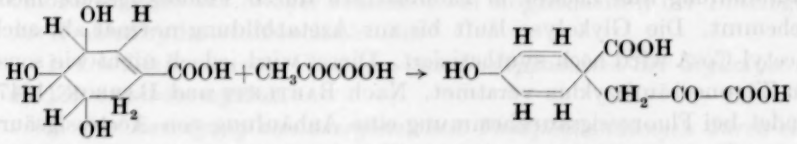
Die Einwirkung von NaF zeigte, daß bei Anwendung einer Konzentration von 10^{-3} mol eine Hemmung der Neubildung von Chlorogensäure aus Zucker stattfindet. *Für die Bildung der Chlorogensäure scheinen damit die Spaltprodukte des Zuckerabbaues verantwortlich zu sein, die nach dem Schritt 2-ph-Glycerinsäure → 2-ph-Enolbrenztraubensäure* liegen. Um eine Entscheidung darüber fällen zu können, ob die Endstufen der Glykolyse oder Zwischenprodukte des Zitronensäurezyklus für die Synthese der Chlorogensäure von Bedeutung sind, wurde der Zitronensäurezyklus blockiert.

Der Zitronensäurezyklus wurde, wie bereits angeführt, durch Fluoressigsäure gehemmt. Nach diesen Untersuchungen wird die Chlorogensäurebildung aus Zucker in Efeublättern durch Fluoressigsäure nicht gehemmt. Die Glykolyse läuft bis zur Azetatbildung normal ab, auch Acetyl-Co-A wird noch synthetisiert. Dieses wird jedoch nicht wie sonst im Zitronensäurezyklus veratmet. Nach Bartlett und Barron (1947) findet bei Fluoressigsäurehemmung eine Anhäufung von Acetessigsäure statt. Es ist anzunehmen, daß ein Teil des Azetats anaerob umgesetzt wird; doch wird der Hauptanteil der anfallenden Stoffe wohl in Seitenkanälen Synthesen zugeleitet.

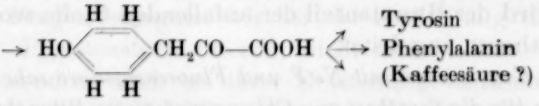
Nach den Ergebnissen mit NaF und Fluoressigsäure scheinen folgende Verbindungen für die Synthese von Chlorogensäure in Betracht zu kommen: ph-Enobrenztraubensäure, Brenztraubensäure und Azetat. Gefüttertes Azetat hatte bei gleichzeitiger Fluoressigsäurehemmung keine fördernde Wirkung auf die Biosynthese von Chlorogensäure. Diese Erscheinung kann wohl auf die schädigende Wirkung des Azetats zurückzuführen sein, wenn diese auch äußerlich bei den Versuchen nicht sichtbar war. Die andere Erklärung, daß das zugeführte Azetat nicht in seine energiereiche Form überführt werden kann, wurde bereits diskutiert. Die Beteiligung von Brenztraubensäure und Azetat an der Biosynthese von Tyrosin bei Hefe beschreiben Thomas und Mitarbeiter (1953). Sie fütterten an Hefe markiertes Azetat und Pyruvat und stellten fest, daß die Radioaktivität im Benzolkern des Tyrosins so verteilt war, daß entweder Oxalazetat oder andere unsymmetrische 4 C-Verbindungen als Zwischenstufen bei der Synthese gedient haben müssen. Die Seitenkette hatte

ihren Ursprung in der Brenztraubensäure. Es wird eine Kondensation von 3 C- + 1 C-Molekülen diskutiert, die zur Bildung von unsymmetrischen 4C-Verbindungen, eventuell über die Verwendung von Azetat führt. Die Beteiligung von symmetrischen 4C-Verbindungen aus dem Zitronensäurezyklus wird abgelehnt. Eine ähnliche Anschauung läßt sich auch aus den hier vorliegenden Versuchen gewinnen, nach denen der Zitronensäurezyklus nicht an der Synthese der Chlorogensäure beteiligt zu sein scheint.

Während jedoch Chlorogensäure bei der Einwirkung von Fluoressigsäure aus Zucker gebildet werden kann, tritt zu gleicher Zeit kein Anthocyan auf. *Dies gibt uns einen Hinweis darauf, daß für die Anthocyansynthese der Zitronensäurezyklus anscheinend unentbehrlich ist.* DAVIS und Mitarbeiter (1954) zeigen in Versuchen an *E. coli*, daß auch der Aufbau der Seitenkette an den 6C- + 3C-Molekülen aus Pyruvat stattfindet. Sie fanden in der für die aromatische Synthese an Mikroorganismen inzwischen bewiesenen Bildungsreihe der Aromaten über Shikimisäure → Phenylbrenztraubensäure ein labiles Zwischenprodukt „Prephenicacid", die möglicherweise aus Shikimisäure + Brenztraubensäure gebildet wird (s. Formeln).



Shikimisäure Prephensäure



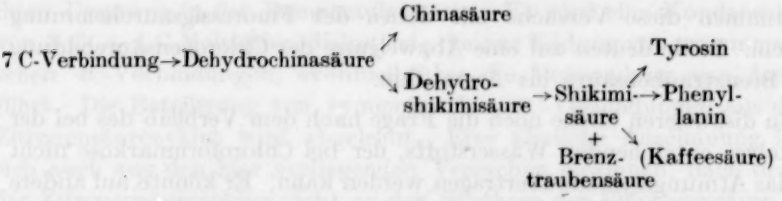
Vor oder während der Anfügung der Seitenkette scheint das Carboxyl der Shikimisäure abgespalten zu werden, so daß die Kette mit drei Kohlenstoffatomen direkt an den Benzolkern angelagert wird (GILVARG und BLOCH 1950). Unsere Ergebnisse stehen mit diesen Anschauungen im Einklang. Um das Problem der Abzweigungsstelle der Chlorogensäurebildung aus der Glykolyse weiter zu klären, wurden die Versuche mit Chloroform durchgeführt. Chloroform wirkt hemmend auf die Atmung und blockiert damit bei spezifischer Einwirkung den Zitronensäurezyklus. Die Versuche waren nur bei so vorsichtiger Dosierung der Chloroformkonzentrationen durchführbar, daß gerade noch eine reversible Hemmung stattfand. Es gelang, die Blattstücke von *Hedera helix* drei Tage lang unter Chloroformnarkose turgeszent und ohne Schädigung zu halten. *Trotz Chloroformnarkose trat keine Hemmung der Chlorogensäurebildung aus Zucker ein.* Nimmt man nun an, daß der Zitronensäurezyklus für die Entstehung der Chlorogensäure nicht verantwortlich ist,

so stimmen diese Versuche mit denen der Fluoressigsäurehemmung überein. Beide deuten auf eine Abzweigung der Chlorogensäurebildung von Brenztraubensäure bis Azetat hin.

Zu diskutieren bliebe noch die Frage nach dem Verbleib des bei der Glykolyse entstehenden Wasserstoffs, der bei Chloroformnarkose nicht auf das Atmungssystem übertragen werden kann. Er könnte auf andere Substrate übertragen werden wie z. B. Brenztraubensäure → Milchsäure oder Oxalessigsäure → Äpfelsäure. Daraus ergeben sich dann wieder neue Ausgangspunkte für Synthesen.

Das Ergebnis der DNP-Versuche scheint im Widerspruch zu den Versuchen mit Chloroform zu stehen. DNP hemmt die Übertragung der bei der Atmung frei werdenden Energie auf ADP → ATP; gleichzeitig wird die Atmung intensiviert. Chloroform hemmt dagegen die Atmung und damit den Energiegewinn. Wie kommt es nun, daß *trotz geringerem Energieangebot* bei der *Chloroformeinwirkung* eine *Synthese* von Chlorogensäure stattfinden kann? Man kann dies vielleicht folgendermaßen erklären: Nimmt man an, daß trotz Chloroformeinwirkung die Glykolyse normal abläuft und nur der Zitronensäurezyklus gehemmt ist, so müssen im Verlauf der Glykolyse vermehrt phosphorylierte Spaltprodukte (z. B. Phosphobrenztraubensäure) anfallen. Diese Verbindungen stehen bereits auf hohem Energieniveau und können Kondensationen eingehen. Nimmt man andererseits an, daß die Synthese von Chlorogensäure vor dem Zitronensäurezyklus abzweigt, so ist die Bildung aus diesen „angehäuften" Bruchstücken des Zuckerabbaues möglich. Zu einem Teil kann sich auch das durch *Substratphosphorylierungen* entstandene ATP an Synthesen beteiligen. Bei DNP-Einwirkung kommt es erst gar nicht zu einer Anhäufung von Spaltprodukten, da diese sofort über den Zitronensäurezyklus ohne Verwendung von Synthesen veratmet werden.

Aus den bisher vorliegenden Versuchen formt sich folgendes unvollständige Bild für die Synthese von Chlorogensäure in Blättern: Im Verlauf der Glykolyse fallen 3 C- und 4 C-Verbindungen an, die zu Vorstufen für die Synthese werden können. Durch Kondensation beider miteinander können sich 7 C-Verbindungen bilden, die in letzter Zeit große Aufmerksamkeit auf sich gezogen haben. Die Bildung von Heptulosen aus Pentosen oder Tetrosen bei der Photosynthese haben Benson und Mitarbeiter (1952), in Enzymextrakt aus Erbsen Horecker und Smyrniotes 1952 untersucht. Ebenso bekommen 3 C-Körper in Form von Triosephosphaten eine zentrale Bedeutung für Synthesen aller Art in der Zelle. Für die aromatische Synthese scheinen vor allen Dingen 7 C-Verbindungen in Betracht zu kommen (Ehrensvärd 1954). Der Weg aus ihnen zu aromatischen Stoffen formt sich über folgende Zwischenprodukte:



Diesem Schema ließe sich die Biosynthese der Chlorogensäure eingliedern. Endgültige Aussagen darüber werden wohl erst dann mit Sicherheit gemacht werden können, wenn die Bildung ihrer Spaltprodukte, Kaffeesäure und Chinasäure, näher untersucht worden ist.

Zusammenfassung.

1. Es wurde eine zuverlässige quantitative Bestimmungsmethode für Chlorogensäure in Pflanzenmaterial ausgearbeitet.

2. In Früchten von *Helianthus annuus* nimmt der Chlorogensäuregehalt während der Fruchtreife zu, während der Samenkeimung dagegen ab. Diese Erscheinung wird mit Fettbildung und Atmung verglichen.

3. Durch Fütterung von 0,1 mol Rohrzuckerlösung läßt sich in Blattstücken von *Hedera helix* eine Neubildung von Chlorogensäure auslösen. Die Bildung erfolgt in Dunkelversuchen nur in geringem Maße gegenüber Lichtversuchen. Es trat Bildung von Anthocyan auf. Mannit und Inosit bewirken keine Synthese von Chlorogensäure.

4. Durch Fütterung von Tyrosin läßt sich keine Chlorogensäuresynthese auslösen.

5. Die Biosynthese von Chlorogensäure aus Zucker wird durch NaF gehemmt.

6. Fluoressigsäurevergiftung hatte keinen hemmenden Einfluß auf die Bildung von Chlorogensäure aus Zucker. Es wurde keine Anthocyanbildung beobachtet.

7. Chloroformnarkose in geringen Konzentrationen hatte keinen hemmenden Effekt auf die Chlorogensäurebildung aus Zucker.

8. DNP hemmt in geeigneten Konzentrationen (7×10^{-5} mol) die Bildung von Chlorogensäure aus Zucker.

9. Es wird ein in Blättern von *Hedera helix* vorkommender Stoff charakterisiert und seine Ähnlichkeit mit Chlorogensäure aufgezeigt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Isomeres der Chlorogensäure.

Herrn Professor Dr. K. PAECH, der mir die Anregung zu dieser Arbeit gab, danke ich herzlich für seine verständnisvolle Förderung der Untersuchungen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für Sachbeihilfen.

Literatur.

BARNES, H. M., J. R. FELDMANN and W. V. WHITE: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4178 (1950). — BARTLETT, G. R., and E. S. BARRON: J. of Biol. Chem. **170**, 67 (1947). — BEEKMANN, H.: Z. Bot. **42**, 387 (1954). — BENSON, A. A. u. Mitarb.:

J. of Biol. Chem. **196**, 703 (1952). — Biale, J. B.: Annual Rev. Plant Physiol. **1**, 183 (1950). — Blank, F.: Bot. Review **13**, 241 (1947). — Bonner, J., and A. Millerd: Arch. of Biochem. **42**, 135 (1953). — Corse, J.: Nature (Lond.) **172**, 771 (1953). — Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1952. — Danner, H.: Bot. Archiv **41**, 168 (1940). — Davis, B. D.: J. of Biol. Chem. **191**, 315 (1951). — J. Bacter. **64**, 749 (1952). — Davis, B. D., U. Weiss, C. Gilvarg and E. S. Mingiolo: Abstracts. Div. Biol. Chem. of Amer. Chem. Soc., April 1954, p. 18 C. — Eberhardt, F.: Planta (Berl.) **43**, 253 (1954); **46**, 57 (1955). — Ehrensvärd, G.: Svensk kem. Tidskr. **66**, 249 (1954). — Elliot, W. B., and G. Kalnitzky: J. of Biol. Chem. **186**, 477 (1950). — Fiedler, U.: Arzneimittel-Forsch. **4** 41 (1954). — Freudenberg, K.: Chem. Ber. **53**, 232 (1920). — Geissman, T. A.: Bot. Review **18**, 77 (1952). — Gilvarg, G., and K. Bloch: J. of Biol. Chem. **199**, 689 (1952). — Gorter, K.: Liebigs Ann. **358**, 327 (1908); **359**, 217 (1908); **379**, 110 (1911). — Arch. Pharmaz. **247**, 184 (1909). — Guseva, A. R.: Dokl. Akad. Nauk USSR., N. S. **94**, 1137 (1954). — Höpfner, W.: Chemiker-Ztg **56**, 991 (1932). — Horecker, B. L., and P. Z. Smyrniotes: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2123 (1952). — Hulme, A. C.: Biochemic. J. **53**, 337 (1953). — Johnson, G., and L. A. Schaal: Science (Lancaster, Pa.) **115**, 627 (1952). — Kandler, O.: Z. Naturforsch. **5b**, 338 (1950). — Kurssanow, A. L.: Biochimia **13**, 530 (1949). — Lipmann, F., and N. O. Kaplan: Annual. Rev. Biochem. **18**, 267 (1949). — Overton, E.: Jb. wiss. Bot. **33**, 171 (1899). — Paech, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin: Springer 1950. — Handbuch der Kältetechnik. Berlin: Springer 1952. — Paech, K., u. F. Eberhardt: Z. Naturforsch. **7b**, 664 (1952). — Paech, K., u. H. Ruckenbrod: Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 75 (1953). — Paech, K., u. W. Simonis: Übungen zur Stoffwechselphysiologie der Pflanze. Berlin: Springer 1952. — Politis, J.: C. r. Acad. Sci. Paris **225**, 954 (1947). — Roberts, E. R., and D. J. Wood: Biochemic. J. **49**, 414 (1951). — Rudkin, G. O., and J. M. Nelson: J. Amer. Chem. Soc. **69**, 1470 (1947). — Schwerdtfeger, A. O.: Naturwiss. **41**, 19 (1954). — Shigeura, H. T. u. Mitarb.: Federat. Proc. **12**, 525 (1953). — Simonds, A. O., G. Johnson and L. A. Schaal: Bot. Gaz. **115**, 190 (1953). — Sreenivasan, P. R. u. Mitarb.: J. of Biol. Chem. (im Druck). Aus Ehrensvärd, Svensk. kem. Tidskr. **66**. — Stadler, L. J.: Amer. J. Bot. **29**, 17 (1942) abstract. — Thimann, K. V., Y. H. Edmondson and B. S. Radner: Arch. of Biochem. **34**, 305 (1951). — Thomas, R. C., V. H. Cheldelin, B. E. Christensen, and C. H. Wang: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 5554 (1953). — Warburg, O.: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin: Saenger 1948. — Warburg, O., u. W. Christian: Biochem. Z. **310**, 384 (1942). — Wehmer, V., u. M. Hadders: In G. Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 3. Wien 1931/33. — Weurman, C., and T. Swain: Nature (Lond.) **172**, 678 (1953).

Heidi von Wahlert-Ruckenbrod, Bremen, Georg-Gröning-Straße 104.

Planta, Bd. 46, S. 46—69 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität München.

ÜBER DEN EINFLUSS ORGANISCHER SÄUREN AUF DIE ATMUNG, DEN AMMONIUMEINBAU UND DEN GEHALT AN FREIEN AMINOSÄUREN VON CHLORELLA.

Von

OTTO KANDLER und HANNA ERNST.

Mit 20 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Februar 1955.)

Einleitung.

Allgemein wird angenommen, daß auch bei *Chlorella* der Kohlenhydratabbau über das MEYERHOF-Schema und den Citronensäurecyclus verläuft. Nachgewiesen sind für *Chlorella* jedoch nur einige Fermente des MEYERHOF-Schemas, also für den Abbau der Glucose bis zur Brenztraubensäure (HOLZER u. HOLZER 1952), während für den Ablauf des Citronensäurecyclus nur indirekte Beweise vorliegen. Es war daher von Interesse, zu untersuchen, in welchem Umfang die verschiedenen Zwischenprodukte des Citronensäurecyclus (ZS) in den Atmungsstoffwechsel einbezogen werden, wenn sie von außen den Algen als Substrat geboten werden. Derartige Untersuchungen liegen bisher nur von ENY (1950, 1951) vor, wobei allerdings ausführlichere Darstellungen der Konzentrations- und p_H-Abhängigkeit der Substratumsetzungen fehlen.

Von besonderem Interesse war es ferner, ob in den Fällen, in denen nach Zugabe von organischen Säuren eine beträchtliche Atmungssteigerung eintritt, auch eine oxydative Assimilation, wie sie bei Zugabe von Glucose (TAYLOR 1951, MYERS 1947, KANDLER 1954) beobachtet wurde, erfolgt. Eine der wichtigsten Assimilationsleistungen der Pflanze ist der Einbau von Stickstoff. Zugesetztes Ammonium wird von *Chlorella*, besonders nach vorhergehender Verarmung, sehr rasch aufgenommen (SYRETT 1953a, b) und reichert sich nicht als freies Ion in der Zelle an, sondern wird zur Aminosäuresynthese benützt. Dazu und besonders zum weiteren Aufbau der Aminosäuren zu Eiweiß benötigt die Zelle beträchtliche Mengen an freier Energie, die aus dem Atmungssubstrat bezogen werden muß. So ist der Ammoniumeinbau bis zu einem gewissen Grade ein Maß für die Energielieferung aus dem Substratumsatz. Methodisch bietet Ammonium den Vorteil, daß es leicht bestimmbar ist.

Neben dem Ammoniumeinbau in Abhängigkeit von der Substratversorgung wurde außerdem auch die Veränderung im Aminosäurebestand der Zellen nach Zugabe von verschiedenen organischen Säuren untersucht.

Material und Methodik.

Verwendet wurde ein Stamm von *Chlorella pyrenoidosa*, der auch zu Photosynthesearbeiten am hiesigen Institut und von Holzer u. Holzer (1952) für einige Fermentnachweise benützt worden war. Die Anzucht erfolgte in 1-Liter-Standzylindern, die ständig von einem CO_2-angereicherten Luftstrom durchperlt wurden. Zur Beleuchtung diente eine 60-Watt-Metallfadenlampe. Die Beleuchtungsstärke an den Cylinderoberflächen betrug etwa 2000—3000 Lux. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 0,4 g KNO_3, 0,1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g KCl; 0,1 g KH_2PO_4; 1 ml Hoaglandsche A-Z-Lösung; Spur $Fe_2(SO_4)_3$; 1000 ml Aqua dest. Eingeimpft wurde jeweils mit einem kleinen Teil der vorhergehenden Ernte bzw. mit Material von Agarkulturen. Die frisch beimpften Kulturgefäße hatten eine leicht grüne Farbe, und die Algen wuchsen so rasch heran, daß nach 3 Tagen eine tief dunkelgrüne Suspension vorlag. Sie wurde bei etwa 20_{00} g abzentrifugiert und die Algen wiederholt mit dest. Wasser gewaschen. Bei dieser Reinigung konnten auch die Bakterien, die in den Rohkulturen in geringem Maße vorhanden waren, abgetrennt werden, da sie erheblich langsamer sedimentieren als die Algen. Vor jedem Versuchsansatz wurde durch gefärbte Ausstrichpräparate auf Bakterienfreiheit geprüft.

Allgemein wurden die Algen nach dem Abzentrifugieren in einer verdunkelten Gaswaschflasche 24 Std im Luftstrom verarmt, da die Atmungssteigerung nach Substratzugabe bei verarmten Algen erheblich deutlicher ist als bei frisch geernteten. Zur Atmungsmessung wurden die Algen in m/45 Phosphatpuffer suspendiert und dann gleiche Suspensionsmengen in die Atmungströge der Warburgapparatur pipettiert. In der Regel wurde zunächst 30 min die Leeratmung gemessen und dann aus den seitlich angesetzten Kippern die entsprechend konzentrierten Substrate zugegeben. Über mehrere Stunden wurde anschließend die Sauerstoffaufnahme in viertelstündigen Ablesungen verfolgt. Für einen typischen Versuch ist die Kinetik der Sauerstoffaufnahme nach Zugabe verschiedener Konzentrationen einer organischen Säure jeweils in einem Kurvenbild dargestellt. Die Mittelwerte der Atmungssteigerung durch die günstigste Konzentration aus einer größeren Zahl von Versuchen sind in einer Tabelle beigegeben.

In den meisten Fällen wurde auch der RQ (CO_2/O_2) bestimmt. Dies erfolgte sowohl nach der 2-Gefäß-Methode als auch mit Hilfe der Dixongefäße. Allgemein wurde bei den manometrischen Versuchen nach den Angaben von Dixon u. Keilin (1952) verfahren. Alle Messungen wurden bei 27° C durchgeführt.

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes erfolgte mit dem Mikrokjeldahlverfahren (vgl. Klein 1932). Das überdestillierte Ammonium wurde in n/50 HCl aufgefangen und die überschüssige Säure mit n/50 NaOH zurücktitriert, so daß einem ml Laugenverbrauch 0,28 mg Stickstoff entsprachen. Die Ammoniumaufnahme der Algen wurde durch Bestimmung des Ammoniumschwundes der Außenlösung während des Versuches gemessen. Die geringen Mengen Ammonium wurden colorimetrisch mit Nesslers Reagens bestimmt (vgl. Lange 1932). Der Ammoniumnachweis wurde durch Glucose und verschiedene organische Säuren gestört, indem Trübungen auftraten. Diese Schwierigkeit konnte durch starke Verdünnung und rasches Messen (genau 3 min nach Zugabe des Reagens) umgangen werden.

Das Trockengewicht wurde nach 24stündigem Trocknen bei 105° C und 24stündigem Aufenthalt in einem Exsiccator über $CaCl_2$ bestimmt.

Die verschiedenen organischen Säuren wurden vor ihrer Verwendung auf den für den betreffenden Versuch gewünschten p_H-Wert durch Neutralisieren mit NaOH eingestellt, so daß im allgemeinen die Na-Salze vorlagen. Die Stammlösungen wurden im Eisschrank aufbewahrt.

Zur Extraktion der freien Aminosäuren aus *Chlorella* wurden die Suspensionen abzentrifugiert, das Sediment in 0,5 ml Wasser suspendiert und 5 min in ein kochendes Wasserbad gestellt. Diese Zeit genügte zur Extraktion. Verlängerung förderte nur die Abspaltung von Peptiden, wie vergleichende Versuche zeigten. Die Extraktion mit 70%igem Methanol bzw. Äthanol brachte keine anderen Ergebnisse.

Die Chromatographie der Aminosäuren wurde in üblicher Weise nach der absteigenden Methode ausgeführt (vgl. Cramer 1953). An Papieren wurde Whatman 1 und Schleicher u. Schüll 2043b verwendet. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch aus Isopropylalkohol-Eisessig-Wasser (70:20:10), bzw. α-Picolin-Wasser-Ammoniak (70:28:2). Entwickelt wurde mit butyl-alkoholischer Lösung von Ninhydrin. Um kräftigere und konstante Farbwerte zu erhalten, wurde nach den Angaben von Brüggemann u. Drepper (1952) der besprühte Bogen 1 min in Wasserdampfatmosphäre von 100° gehängt und dann 5 min im Trockenschrank auf 100° C erhitzt. Anschließend wurden die Farbflecke durch Besprühen mit alkoholischer Kupfernitratlösung nach den Angaben von Wieland u. Kaweran (1951) fixiert. Dabei gehen die in verschiedenen Rot- und Violettönen spielenden Aminosäure-Ninhydrin-Komplexe in ein einheitliches Rot über. Nur die Gelbfärbung des Prolinfleckes kann nicht erhalten werden.

In einigen Fällen wurden die eindimensionalen Chromatogramme in Streifen geschnitten, in eine Transparentlösung eingelegt und durch Vorbeiziehen an einer Photozelle (Elphor H der Firma Bender & Hobein, München) ausgewertet. Andere Chromatogramme wurden unter Verwendung eines Grünfilters photographiert, und einige derartiger Aufnahmen sind im letzten Abschnitt beigefügt.

Versuchsergebnisse.

1. Die Atmung nach Zugabe verschiedener organischer Säuren.

Wenn Chlorellen im Dunkeln längere Zeit verarmt werden, sinkt der Sauerstoffverbrauch kontinuierlich ab und steigt nach Zugabe von Glucose innerhalb einer Stunde bis auf das 6fache wieder an. Der RQ fällt mit zunehmender Verarmung ebenfalls ab, da an Stelle von Kohlenhydraten in zunehmendem Maße auch Fette und vielleicht Eiweiß abgebaut werden. Mit anhaltender Glucosefütterung steigt aber der RQ nicht nur auf den theoretischen Wert für Glucose, also 1,0, sondern darüber hinaus auf etwa 1,2—1,3 an, da nunmehr umgekehrt neben Polysacchariden auch Fette aufgebaut werden (Kandler 1954). In den folgenden Darstellungen soll nun gezeigt werden, in welchem Umfange und unter welchen Bedingungen die Glucose durch organische Säuren ersetzt werden kann. Dabei wurden in allen Fällen 24—48 Std vorverdunkelte Chlorellen, die in dest. Wasser suspendiert und durchlüftet waren, verwendet.

Essigsäure. Als „aktivierte Essigsäure", deren Natur als Acetyl-CoA von Lynen u. Mitarb. (1951) aufgeklärt werden konnte, nimmt die Essigsäure eine zentrale Stelle im Stoffwechsel ein. Eine große Zahl von Verbindungen wie Fette, Terpene und Ringsysteme wird über diesen C_2-Baustein aufgebaut. Als erster konnte Myers (1949) zeigen, daß Essigsäure aus der Suspensionslösung von *Chlorella* aufgenommen und mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wie Glucose oxydiert wird. Der

Abbau erfolgt dabei bis zu CO_2 und Wasser. Wie die Abb. 1 zeigt, können aber nur relativ geringe Konzentrationen von 0,001 bis 0,006 m vertragen und mit großer Geschwindigkeit umgesetzt werden. 0,025 m hemmt bereits so stark, daß die Leeratmung nicht mehr wesentlich erhöht wird, und stärkere Konzentrationen führen sogar zu einer Hemmung der Leeratmung. Bei Material verschiedener Ernten lag die Grenzkonzentration nicht immer bei 0,025 m, sondern gelegentlich auch höher, und 0,025 m bewirkte dann noch eine Steigerung, die allerdings stets geringer war als die durch 0,006 m ausgelöste.

Bei den schwachen Konzentrationen war die absolute Menge an Acetat sehr gering und entsprechend rasch verbraucht, was den Abfall der Kurven bedingt. Sowohl der bei allen fördernden Konzentrationen gleich steile Kurvenanstieg, als auch der rasche Abfall nach Verbrauch des Substrats zeigen an, daß die Essigsäure bis zu sehr geringen Konzentrationen herab mit maximaler Geschwindigkeit in den Atmungsstoffwechsel einbezogen wird.

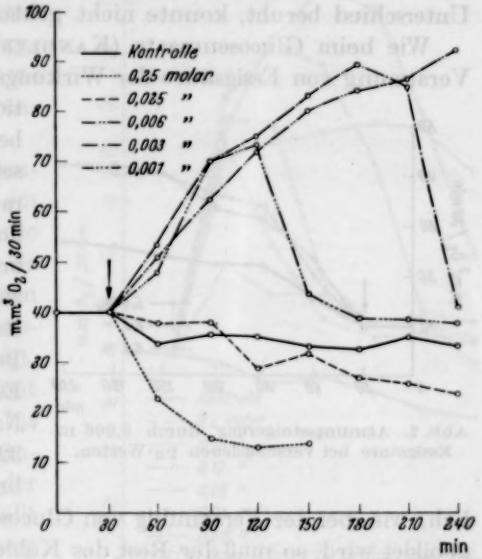


Abb. 1. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Konz. Essigsäure. pH = 6,0, t = 27° C, m/45 Phosphatpuffer.

Während in Abb. 1 nur die pro 30 min verbrauchten mm^3 O_2, bezogen auf die in den Gefäßen befindlichen 3 ml Suspension, angegeben sind, enthält die Tabelle 1 die Mittelwerte für die Q_{O_2}-Werte (mm^3 O_2/mg Trockengew./Stunde), die innerhalb der ersten 3 Std bei der optimalen Konzentration von 0,006 m erreicht wurden.

Tabelle 1. *Q_{O_2}-Werte für die Essigsäureatmung.*

Anzahl der Versuche	Konzentration molar	Substratatmung Q_{O_2} Mittelwerte			Atmungssteigerung (Verhältnis zur Leeratmung)		
		1. Std	2. Std	3. Std	1. Std	2. Std	3. Std
5	0	2,7	2,6	2,5	1	1	1
	0,006	5,6	7,6	7,2	2,1	2,9	2,5

In mehreren Parallelproben wurde neben dem Sauerstoffverbrauch auch der RQ während der Essigsäureoxydation bestimmt. Sowohl mit der 2-Gefäß-Methode als auch bei Verwendung der Dixongefäße ergab

sich ein RQ von 0,95 bis 1,05. Dies stimmt mit dem theoretischen Wert von 1,0 weitgehend überein.

Bereits Myers (1949) wies darauf hin, daß Essigsäure nur bei p_H-Werten nahe dem Neutralpunkt veratmet werden kann. Dies bestätigen auch die eigenen Versuche, wie Abb. 2 zeigt. Auch Eny (1951) kam zu entsprechenden Ergebnissen, doch fand sie eine zehnfach höhere Konzentration an Essigsäure optimal. Derartige Konzentrationen wirkten jedoch in den eigenen Versuchen stets stark hemmend. Worauf dieser Unterschied beruht, konnte nicht geklärt werden.

Wie beim Glucoseumsatz (Kandler 1954) läßt sich auch für die Veratmung von Essigsäure der Wirkungsgrad der oxydativen Assimilation bestimmen. Dazu wird eine bestimmte Menge Acetat aus dem seitlichen Kipper zu der im Hauptraum der Atmungströge befindlichen Algensuspension gekippt und der Sauerstoffverbrauch bis zum Atmungsabfall, der den Substratverbrauch anzeigt, gemessen. Bei vollständiger Oxydation der Essigsäure werden für 1 mg Na-Acetat (+ Kristallwasser) 329 mm³ Sauerstoff verbraucht, bzw. CO_2 gebildet. Wenn tatsächlich, wie bei der Veratmung von Glucose, weniger CO_2 pro mg Acetat gebildet wird, so muß der Rest des Kohlenstoffes der Essigsäure assimiliert worden sein. Das Verhältnis eingebaute/veratmete Essigsäure ergibt dann den Wirkungsgrad der oxydativen Assimilation, der kurz „synthetischer Wirkungsgrad" (SW) (vgl. Kandler 1953) genannt werden soll. Die Tabelle 2 enthält die zur Berechnung nötigen Daten.

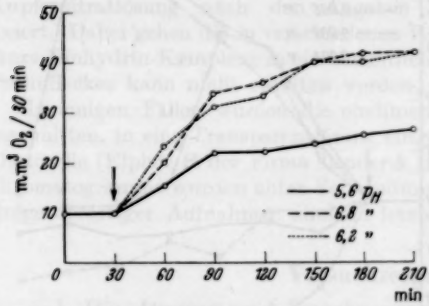


Abb. 2. Atmungssteigerung durch 0,006 m Essigsäure bei verschiedenen p_H-Werten.

Tabelle 2. *Daten zur Berechnung des SW der Essigsäureoxydation.*

mm³ O_2/mg Essigsäure, gesamt	198
mm³ CO_2/mg Essigsäure gesamt	203
mm³ O_2/mg Essigsäure, korrigiert	103
mm³ CO_2/mg Essigsäure, korrigiert	105
SW, gesamt	0,64
SW, korrigiert	2,13

Bei der Berechnung des SW ergibt sich die Schwierigkeit, daß man nicht angeben kann, ob während der Essigsäureoxydation die Leeratmung im vollen Umfang weiter abläuft oder ob sie durch das neue Substrat zurückgedrängt worden ist. Je nachdem, welche Annahme man macht, ergeben sich verschiedene Werte. Dementsprechend sind in der Tabelle 2 beide Möglichkeiten berücksichtigt, wobei die Anmerkung „korrigiert" angibt, daß bei diesen Zahlen der Sauerstoffverbrauch bzw.

CO_2-Produktion der Leeratmung von der Gesamtatmung abgezogen wurde. Eine Entscheidung, welche der beiden Berechnungsarten die zutreffendere ist, kann vermutlich nicht ohne Verwendung markierter Verbindungen, die uns zur Zeit nicht zur Verfügung stehen, getroffen werden.

Vergleicht man den SW für die Essigsäureoxydation mit dem für den Glucoseumsatz, so kann man sagen, daß er etwa nur halb so groß ist. Unsere Ergebnisse bestätigen auch die Befunde von MYERS (1949), der fand, daß zur Oxydation von 1 Mol Essigsäure etwas mehr als 1 Mol O_2 notwendig ist.

Brenztraubensäure. Eine ebenfalls sehr wichtige Stellung im Atmungsstoffwechsel nimmt die Brenztraubensäure ein. Auch sie wird, als Substrat zu verarmten Algen zugesetzt, sehr rasch umgesetzt. Wie die Abb. 3 zeigt, ist die Atmungsgeschwindigkeit in weiten Grenzen (0,015 bis 0,25 m) konzentrationsunabhängig. Entsprechend wie bei der Verwendung von Essigsäure fällt die Atmung nach Erschöpfung des Substrates sehr rasch wieder ab. Allerdings war zum Zeitpunkt des Abfalles noch Brenztraubensäure mit Dinitrophenylhydrazin nachweisbar. Vermutlich handelte es sich dabei aber um Kondensationsprodukte von Brenztraubensäure, während die freie Säure verbraucht war.

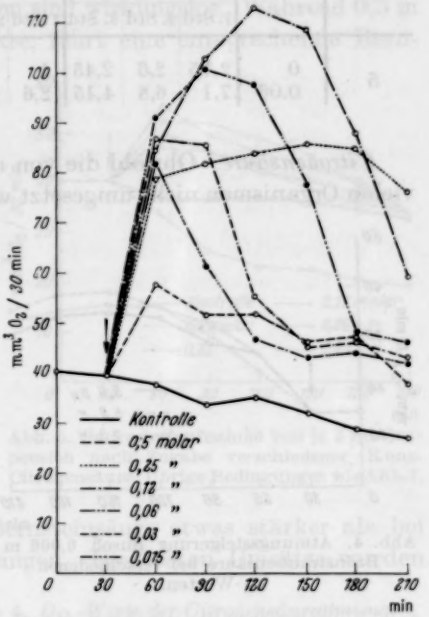


Abb. 3. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Brenztraubensäure-Konz. Bedingungen wie Abb. 1.

Wie die in Tabelle 3 angeführten Mittelwerte der Atmungssteigerung durch Brenztraubensäure zeigen, werden mit diesem Substrat die gleichen Umsatzgeschwindigkeiten erreicht wie mit Essigsäure. Die RQ-Bestimmung ergab nach der Gefäß-Methode 1,15, mit Hilfe der Dixongefäße 1,3. Ähnliche Differenzen beim Vergleich der beiden Methoden traten auch bei anderen Substraten auf und hängen vielleicht damit zusammen, daß der Substratumsatz nicht ganz unabhängig vom CO_2-Partialdruck ist, wie aus anderen Versuchen (KANDLER 1954) hervorgeht. Gleichartigkeit des Stoffwechsels in beiden Gefäßen ist aber für die Anwendung der 2-Gefäß-Methode Voraussetzung. Es darf daher

den mit Hilfe der Dixongefäße erhaltenen Werten der Vorzug gegeben werden. Sie entsprechen auch weitgehend dem theoretischen Wert von 1,3.

Tabelle 3. *Q_{O_2}-Werte der Brenztraubensäureatmung.*

Anzahl der Versuche	Konzentration molar	Substratatmung Q_{O_2} Mittelwerte			Atmungssteigerung (Verhältnis zur Leeratmung)		
		1. Std	2. Std	3. Std	1. Std	2. Std	3. Std
5	0	2,75	2,6	2,45	1	1	1
	0.06	7,1	6,8	4,15	2,6	2,6	1,8

Der Brenztraubensäureumsatz ist vom p_H-Wert der Lösung erheblich weniger abhängig als die Essigsäureatmung. Aus Abb. 4 geht hervor, daß die Umsatzgeschwindigkeit in einem Bereich von 5,4 bis 7,0 praktisch gleich ist.

Citronensäure. Obwohl die von außen zugesetzte Citronensäure von vielen Organismen nicht umgesetzt werden kann, gehört sie nach neueren Untersuchungen (MARTIUS 1949, MARTIUS u. LYNEN 1950) doch in den direkten Weg des Kohlenhydratabbaues. Daß z. B. Hefe nach Zugabe von Citronensäure keine Atmungssteigerung zeigt, wird durch die Annahme erklärt, daß die Plasmagrenzschichten für diesen Stoff nicht permeabel sind. *Chlorella* zeigt immerhin einen Atmungsanstieg von etwa 30% (Abb. 5, Tabelle 4), der allerdings sehr bald wieder zurückgeht. Der Atmungsanstieg kann mit einem relativ weiten Konzentrationsbereich erzielt werden, und erst 0,5 m wirkt auch deutlich hemmend auf die Leeratmung.

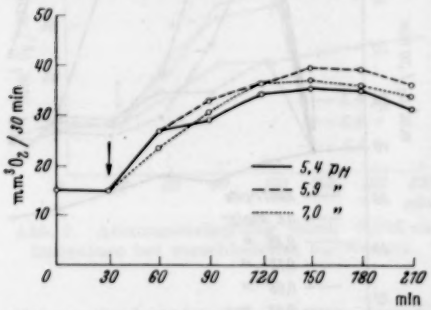


Abb. 4. Atmungssteigerung durch 0,006 m Brenztraubensäure bei verschiedenen p_H-Werten.

Der Abfall der Atmung kann auf keinen Fall auf einen Substratverbrauch zurückgeführt werden, da er bei allen Konzentrationen gleichzeitig eintritt. Offensichtlich verfügt *Chlorella* nicht über ein geeignetes Ferment, um freie Citronensäure in den Stoffwechsel in größerem Umfang einzubeziehen. Die Annahme, daß Citronensäure nicht permeieren könne, scheidet für *Chlorella* aus, da sonst auch der anfängliche Atmungsanstieg nicht auftreten könnte.

Der RQ wurde mit der Dixonmethode zwischen 1,04 und 1,13 bestimmt. Dies entspricht den Erwartungen, da der RQ für reine Citronensäureatmung 1,3 betragen würde, in Wirklichkeit aber nur etwa $^1/_3$ der Gesamtatmung auf Citronensäure zurückgeht und somit ein Summenwert resultieren muß.

Bei den üblichen p_H-Werten zwischen 5 und 7 ergaben sich keine Unterschiede in der Geschwindigkeit des Citronensäureumsatzes. Nur im stärker saueren Bereich war er erheblich geringer (Abb. 6).

Bernsteinsäure. Als weiteres Glied des Citronensäurecyclus wurde Bernsteinsäure untersucht. Auch sie wird nur sehr schwach umgesetzt (Abb. 7, Tabelle 5). 0,12 und 0,25 m-Lösungen bewirken eine etwa 25—50%ige Atmungssteigerung, die aber wie bei Citronensäure rasch abfällt. Schwächere Konzentrationen sind wirkungslos. Während 0,5 m Citronensäure stark hemmend wirkte, führt eine entsprechende Bernsteinsäurelösung noch zu einer allerdings sehr schwachen Atmungsförderung.

Der RQ-Wert ist nach Zugabe von Bernsteinsäure auf 1,2 bis 1,4 erhöht, obwohl der theoretische Wert für vollständige Oxydation nur 1,14 betragen würde. Demnach muß mit einer unvollständigen Oxydation oder mit einer sekundären Beeinflussung des übrigen Atmungsstoffwechsels durch Bernsteinsäure gerechnet werden.

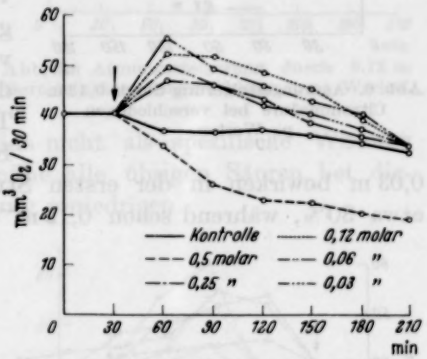


Abb. 5. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Konz. Citronensäure. Übrige Bedingungen wie Abb. 1.

Die p_H-Abhängigkeit ist bei Bernsteinsäure etwas stärker als bei den vorher besprochenen Verbindungen. Die besten Umsätze wurden zwischen p_H 6 und 7 erreicht, während p_H 5,5 deutlich niedrigere Werte erbrachte (Abb. 8). Unter p_H 4,5 erfolgt praktisch kein Umsatz mehr.

Tabelle 4. *Q_{O_2}-Werte der Citronensäureatmung.*

Anzahl der Versuche	Konzentration molar	Substratatmung Q_{O_2} Mittelwerte			Atmungssteigerung (Verhältnis zur Leeratmung)		
		1. Std	2. Std	3. Std	1. Std	2. Std	3. Std
6	0	2,2	1,9	1,7	1	1	1
	0.06	2,9	2,5	2,3	1,3	1,2	1,36

Äpfelsäure. Ganz ähnlich wie Bernsteinsäure verhält sich auch die Äpfelsäure. Auch sie führt nur in der ersten Stunde zu einer 50 bis 100%igen Atmungssteigerung (Abb. 9, Tabelle 6), und der anschließende Atmungsabfall kann wiederum nicht auf einem Verbrauch des Substrats beruhen. Optimal ist eine 0,25 m-Lösung.

Die Ergebnisse der RQ-Bestimmung waren sehr schwankend. Je nach Verwendung der 2-Gefäß-Methode oder der Dixonmethode ergaben sich Werte von 1,05 bis 1,3. Auch hier kann man die Ursache für die Abweichungen in der je nach der verwendeten Methode unterschiedlichen

Gasphase suchen. Die p_H-Abhängigkeit war für Äpfelsäure sehr gering. In einem Bereich zwischen 4,8 und 7 ergaben sich keine deutlichen Unterschiede in der Atmungssteigerung.

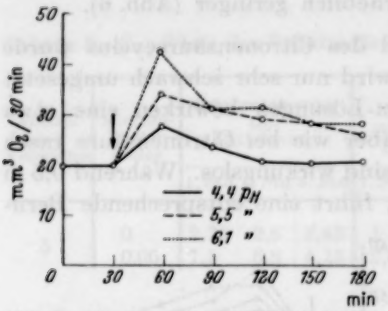


Abb. 6. Atmungssteigerung durch 0,12 m Citronensäure bei verschiedenen p_H-Werten.

Milchsäure. Wenn auch nicht unmittelbar in den üblichen Abbauweg der Kohlenhydrate gehörig, ist die Milchsäure doch ein sehr häufiges Stoffwechselzwischenprodukt, das von den meisten Organismen sehr gut veratmet werden kann. *Chlorella* vermag dies nur in sehr bescheidenem Umfang, wie Abb. 10 und Tabelle 7 zeigen. Nur sehr schwache Konzentrationen wie 0,015 und 0,03 m bewirken in der ersten Stunde eine mittlere Steigerung um etwa 30%, während schon 0,12 m das Niveau der Leeratmung nicht mehr verändert und noch stärkere Konzentrationen nach kurzer Zeit die Atmung vollständig hemmen.

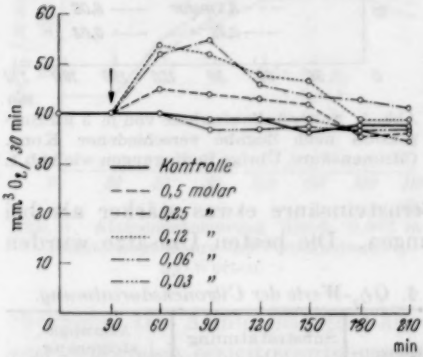


Abb. 7. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Konz. Bernsteinsäure. Übrige Bedingungen wie Abb. 1.

Die p_H-Abhängigkeit war wiederum sehr gering. Zwischen p_H 5 und 7 ergaben sich keine wesentlichen Abweichungen. Der RQ wurde mit beiden Methoden zu 0,9 bis 1,0 bestimmt.

Während alle bisher angeführten organischen Säuren in einer größeren Zahl von Versuchen mit Material verschiedener Ernten untersucht worden waren, wurden einige weitere im Anschluß an später zu beschreibende Versuche über die Wirkung organischer Säuren auf die Decarboxylierung von Glutaminsäure nur in je 2 Parallelen auf ihre Eignung als Atmungssubstrat geprüft. Dabei wurden von jeder Verbindung die gleichen Konzentrationen bei p_H 5,5 verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abb. 11a—e zusammengestellt.

Tabelle 5. *Q_{O_2}-Werte der Bernsteinsäureatmung.*

Anzahl der Versuche	Konzentration molar	Substratatmung Q_{O_2} Mittelwerte			Atmungssteigerung (Verhältnis zur Leeratmung)		
		1. Std	2. Std	3. Std	1. Std	2. Std	3. Std
9	0	2,5	2,3	2,2	1	1	1
	0,12	3,8	2,8	2,6	1,5	1,2	1,2

Malonsäure. Malonsäure gilt allgemein als Atmungsgift, das in den Citronensäurecyclus eingreift, indem es auf Grund seiner sterischen Ähnlichkeit mit der Bernsteinsäure diese von der Succinodehydrase abdrängt. Bei *Chlorella* trifft dies nur für die Glucoseatmung zu (unveröffentlichte eigene Versuche). Die Leeratmung wird dagegen nicht nur nicht gehemmt (Abb. 11a), sondern ganz entsprechend wie bei Zusatz einiger anderer organischer Säuren in den ersten Stunden etwa 30% gefördert. Stärkere Konzentrationen wirken dann allerdings hemmend, doch kann das nicht als spezifische Wirkung angesehen werden, weil auch beinahe alle übrigen Säuren bei diesen Konzentrationen die Leeratmung erniedrigen.

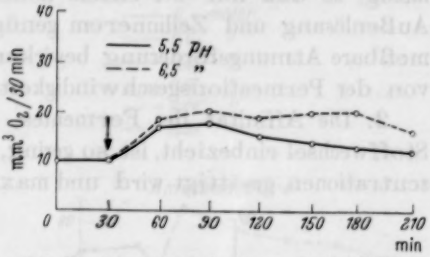


Abb. 8. Atmungssteigerung durch 0,12 m Bernsteinsäure bei verschiedenen p_H-Werten.

Fumarsäure. Fumarsäure ist beim normalen Kohlenhydratabbau das Folgeprodukt der Bernsteinsäuredehydrierung und wird zu Äpfelsäure umgelagert. Entsprechend diesen beiden Säuren wird sie auch von *Chlorella* in geringem Umfang in den Atmungsstoffwechsel einbezogen, wie die Abb. 11b zeigt.

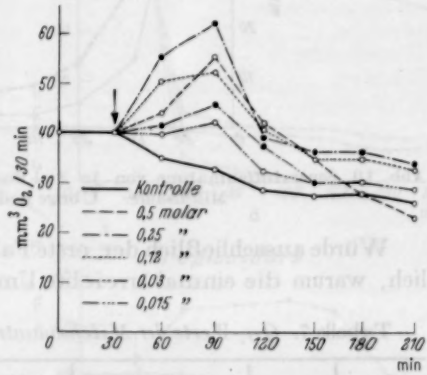


Abb. 9. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Konz. Äpfelsäure. Übrige Bedingungen wie Abb. 1.

Weinsäure. Nach einem wiederum etwa 30%igen Atmungsanstieg in den ersten 30 min nach Weinsäurezugabe sinkt die Atmung auf den Leerwert ab (Abbildung 11c). Die Höhe des Atmungsanstieges zeigt dabei eine ausgeprägte Konzentrationsabhängigkeit, wie sie weniger stark ausgeprägt bei einigen anderen Säuren (z. B. Äpfelsäure, Fumarsäure und Malonsäure) auftritt. Dieses Verhalten steht in deutlichem Gegensatz zu dem von Essigsäure und Brenztraubensäure, die in allen überhaupt fördernden Konzentationen in den ersten Minuten die gleiche Steilheit des Atmungsanstieges zeigen. Für die starke

Tabelle 6. *Q_{O_2}-Werte der Äpfelsäureatmung.*

Anzahl der Versuche	Konzentration molar	Substratatmung Q_{O_2} Mittelwerte			Atmungssteigerung (Verhältnis zur Leeratmung)		
		1. Std	2. Std	3. Std	1. Std	2. Std	3. Std
7	0	2,4	2,2	2,0	1	1	1
	0,25	4,8	3,4	3,4	2,0	1,5	1,7

Konzentrationsabhängigkeit können 2 verschiedene Ursachen angeführt werden:

1. Die Plasmagrenzschichten sind für diese Säuren nur wenig durchlässig, so daß nur bei einem hohen Konzentrationsgefälle zwischen Außenlösung und Zellinnerem genügend Substrat eindringt, um eine meßbare Atmungsförderung bewirken zu können. Die Atmung ist also von der Permeationsgeschwindigkeit abhängig.

2. Die Affinität des Fermentes, das die betreffende Säure in den Stoffwechsel einbezieht, ist so gering, daß es erst bei relativ hohen Konzentrationen gesättigt wird und maximalen Umsatz ermöglicht.

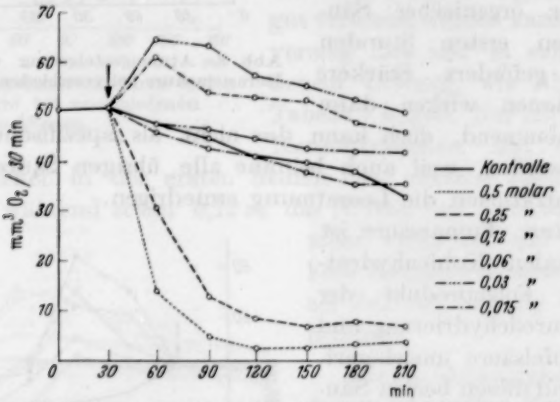


Abb. 10. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Konz. Milchsäure. Übrige Bedingungen wie Abb. 1.

Würde ausschließlich der erste Fall zutreffen, so wäre es unverständlich, warum die einmal erreichte Umsatzgeschwindigkeit nicht bis zum Verbrauch des Substrats beibehalten wird, wenn man nicht eine im Laufe der Zeit zunehmende Permeabilitätsverminderung annehmen will. Vermutlich besitzt *Chlorella* keine leistungsfähigen Fermentsysteme zum Abbau freier Säuren. Wird der in den natürlichen Gleichgewichten vorliegende Spiegel an freien Säuren durch Zufuhr von außen erhöht, so kommt es nur in sehr begrenztem Umfang zu einem beschleunigten Umsatz. Bei zu starker Erhöhung und bei Dauereinwirkung tritt dagegen eine Störung des Gesamtsystems ein. Genauere Vorstellungen über den Mechanismus dieser Störungen sind wohl nur nach eingehenderen Studien dieser Effekte möglich.

Tabelle 7. *Q_{O_2}-Werte der Milchsäureatmung.*

Anzahl der Versuche	Konzentration molar	Substratatmung Q_{O_2} Mittelwerte			Atmungssteigerung (Verhältnis zur Leeratmung)		
		1. Std	2. Std	3. Std	1. Std	2 Std.	3. Std
6	0	2,6	2,3	2,2	1	1	1
	0,03	3,4	3,0	2,9	1,3	1,3	1,3

Ameisensäure. Diese einfachste organische Säure wirkt schon in sehr geringen Konzentrationen stark hemmend auf die Leeratmung und kann

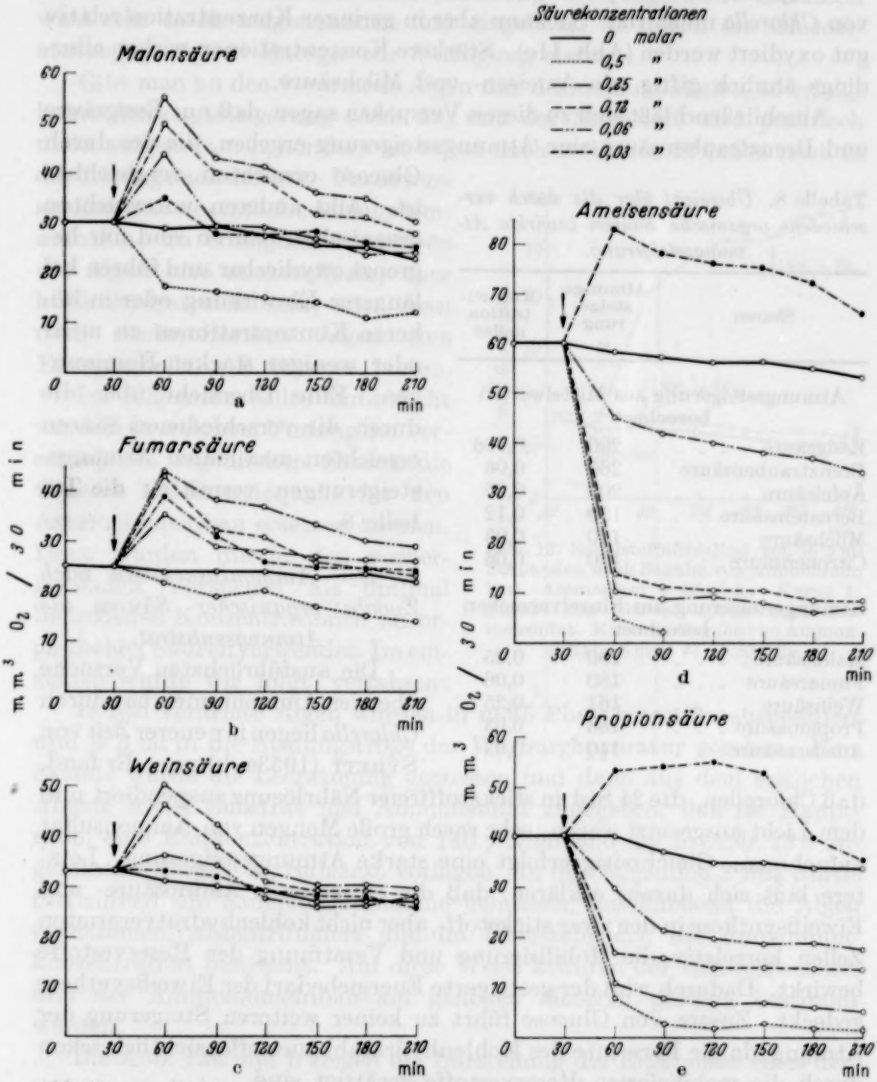


Abb. 11a—e. Sauerstoffaufnahme nach Zugabe verschiedener Konz. org. Säuren. p_H 5,5, m/45 Phosphatpuffer, t = 27° C.

nur bei der sehr geringen Konzentration von 0,03 m abgebaut werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen Säuren erfolgt aber dabei eine vollständige Oxydation, ohne daß im Laufe der Zeit eine Hemmung und

damit ein Atmungsabfall vor Verbrauch des Substrates eintreten würde (Abb. 11d).

Propionsäure. Propionsäure kommt normalerweise im Stoffwechsel von *Chlorella* nicht vor. Sie kann aber in geringer Konzentration relativ gut oxydiert werden (Abb. 11e). Stärkere Konzentrationen wirken allerdings ähnlich giftig wie Ameisen- und Milchsäure.

Abschließend läßt sich zu diesen Versuchen sagen, daß nur Essigsäure und Brenztraubensäure eine Atmungssteigerung ergeben, die der durch Glucose erreichten vergleichbar ist. Alle anderen untersuchten organischen Säuren sind nur begrenzt oxydierbar und führen bei längerer Einwirkung oder in höheren Konzentrationen zu mehr oder weniger starken Hemmungen. Eine Übersicht über die durch die verschiedenen Säuren erreichten maximalen Atmungssteigerungen vermittelt die Tabelle 8.

Tabelle 8. *Übersicht über die durch verschiedene organische Säuren bewirkte Atmungssteigerung.*

Säuren	Atmungssteigerung %	Konzentration molar
Atmungssteigerung aus Mittelwerten berechnet		
Essigsäure	290	0,006
Brenztraubensäure	260	0,06
Äpfelsäure	200	0,25
Bernsteinsäure . .	150	0,12
Milchsäure	130	0,03
Citronensäure . . .	130	0,06
Atmungssteigerung aus Einzelversuchen berechnet		
Malonsäure	190	0,25
Fumarsäure . . .	180	0,06
Weinsäure	161	0,25
Propionsäure . . .	158	0,03
Ameisensäure . . .	140	0,03

2. Der Ammoniumeinbau nach Zugabe organischer Säuren als Atmungssubstrat.

Die ausführlichsten Versuche über den Ammoniumeinbau durch *Chlorella* liegen in neuerer Zeit von Syrett (1953a, b) vor. Er fand, daß Chlorellen, die 24 Std in stickstofffreier Nährlösung suspendiert und dem Licht ausgesetzt waren, sehr rasch große Mengen von Ammonsulfat aufnehmen. Gleichzeitig erfolgt eine starke Atmungssteigerung. Letztere läßt sich daraus erklären, daß die einsetzende Aminosäure- und Eiweißsynthese in den zwar stickstoff-, aber nicht kohlenhydratverarmten Zellen korrelativ die Mobilisierung und Veratmung der Reservestoffe bewirkt. Dadurch wird der gesteigerte Energiebedarf der Eiweißsynthese gedeckt. Zusatz von Glucose führt zu keiner weiteren Steigerung der Atmung, da die Fermente des Kohlenhydratabbaues offensichtlich schon durch die mobilisierten Reservestoffe gesättigt sind.

In den eigenen Versuchen wurden die Algen sowohl stickstoff- als auch kohlenhydratverarmt, indem die normal kultivierten Algen in dest. Wasser unter Durchlüftung im Dunkeln gehalten wurden. Dabei werden in den ersten 48 Std die Reserven weitgehend abgebaut, und die Atmung erreicht einen sehr niederen, nur noch sehr langsam weiter abfallenden

Wert. Gibt man zu derartigen Algen Glucose, so erfolgt ein steiler Atmungsanstieg, der durch Zugabe von Ammonium nur mehr unwesentlich weiter erhöht werden kann (Abb. 12). Der zugeführte Stickstoff wird sehr rasch aufgenommen und eingebaut, da durch die Glucoseatmung genügend Energie zur Verfügung steht.

Gibt man zu den verarmten Algen nur Ammonium alleine, so erfolgt keine Atmungssteigerung (Abb. 12), und der Stickstoff wird praktisch nicht aufgenommen, sondern ist selbst nach mehreren Stunden noch in der Lösung nachweisbar. Um in kurzer Zeit eine wesentliche Ammoniumaufnahme zu ermöglichen, müssen die Algen also stickstoffarm, aber kohlenhydratreich sein, oder man muß stickstoffarmen Algen eine Energiequelle, z. B. Glucose, bieten.

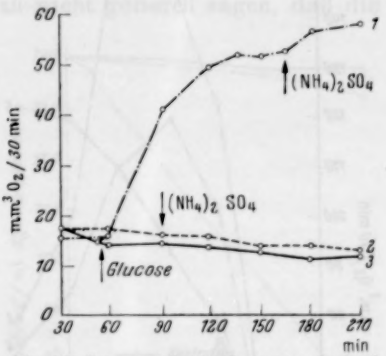


Abb. 12. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe von Ammonium, bzw. Ammonium + Glucose. Kurve 1: Zugabe von Glucose, später auch Ammonsulfat. Kurve 2: Zugabe von Ammonsulfat. Kurve 3: Kontrolle.

Im folgenden sollte untersucht werden, in welchem Umfang die verschiedenen organischen Säuren die Glucose als Energiequelle für den Ammoniumeinbau ersetzen können. Dazu wurden die in den vorhergehenden Versuchen als optimal befundenen Konzentrationen an organischen Säuren verwendet. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

48 Std verarmte Algen wurden in m/45 Phosphatpuffer suspendiert und je 3 ml in die Atmungströge der Warburgapparatur gegeben. Eine Stunde wurde die Leeratmung gemessen und dann aus dem seitlichen Ansatz soviel Substrat und Ammonsulfat zugegeben, daß im Hauptraum eine Endkonzentration von 140 γ N/ml und die in Abb. 13b angeführten Mengen an Substrat vorlagen. In den folgenden 3 Std wurde fortlaufend die Sauerstoffaufnahme gemessen, anschließend die Algen entnommen, abzentrifugiert und im Überstehenden die Ammoniumkonzentration bestimmt. Auf diese Weise konnten der Gasstoffwechsel und der Ammoniumeinbau am gleichen Material parallel bestimmt werden.

Die Abb. 13a und b zeigen die Darstellung der Ergebnisse eines derartigen typischen Versuches. Die zusammengehörigen Kurven und Säulen sind mit gleichen Nummern versehen. Der Atmungsverlauf entspricht den Verhältnissen, wie sie im vorhergehenden Kapitel dargestellt worden sind. Überraschend ist das Ergebnis der Restammoniumbestimmung. Nur wenn Glucose als Substrat geboten wurde, erfolgte ein sehr kräftiger Ammoniumeinbau, während weder Brenztraubensäure, noch

Essigsäure, die beide zu einer kräftigen Atmungssteigerung geführt hatten, eine wesentliche Stickstoffabnahme in der Außenlösung bewirkten. Auch die Werte für die übrigen Säuren schwanken nur um kleine Beträge um den Nullwert, wie es der normalen Streuung entspricht. Bei zahlreichen Wiederholungen dieser Versuche, wobei auch andere als die angeführten Konzentrationen verwendet wurden, ergab sich immer der gleiche Sachverhalt: trotz Atmungssteigerung keine Ammoniumaufnahme mit organischen Säuren als Substrat.

Wiederholt wurde auch die Kinetik der Ammoniumaufnahme

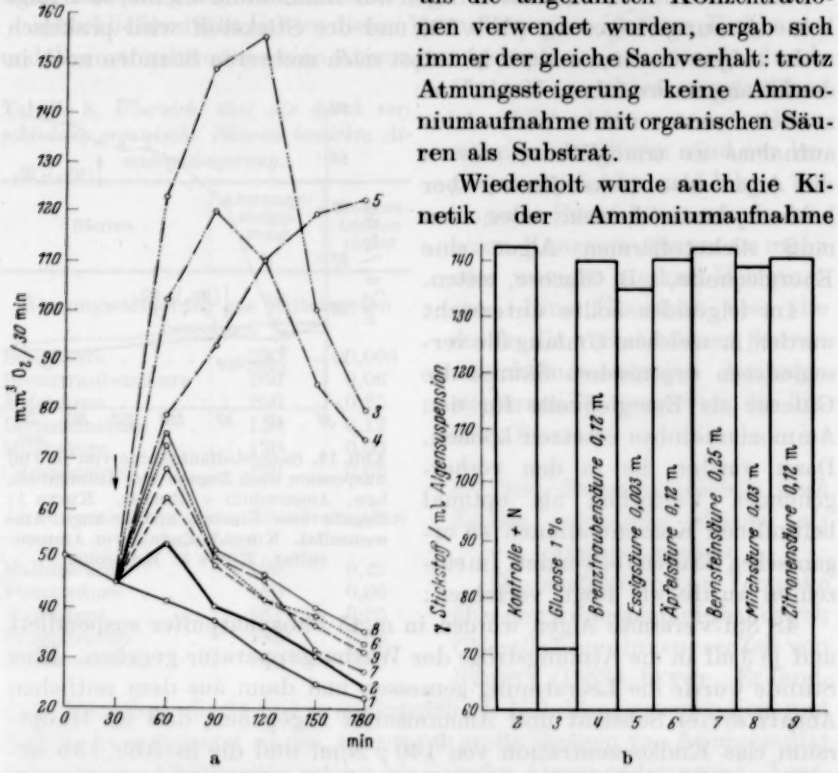


Abb. 13a u. b. a Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Substrate + Ammonsulfat. Kurve 1: Kontrolle. Übrige Kurven entsprechen den Bedingungen der Zahlen in Abb. 13b. b Ammoniumgehalt der Suspensionslösung nach 3 Std Substratumsatz.

untersucht. Dabei wurden die Algen in Erlenmeyerkölbchen unter Zusatz entsprechender Substratkonzentrationen geschüttelt und in Abständen von je einer Stunde Proben entnommen. Ein typisches Ergebnis zeigt Abb. 14. Mit Glucose verläuft die Ammoniumaufnahme in den untersuchten 3 Std völlig linear. Ohne Substrat erfolgt nur eine sehr minimale, nicht signifikante Aufnahme und auch Essigsäure führt nur zu sehr geringen, statistisch in keiner Weise sicherbaren Differenzen.

Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen, die Mothes (1953) bei Bäckerhefe erzielte. Auch bei diesem Objekt konnte er durch Zusatz

von organischen Säuren keine Ammoniumaufnahme beobachten, mit Ausnahme von Milchsäure, die bei Hefe Zucker ersetzen konnte. Angaben über die Verwertung der organischen Säuren im Atmungsstoffwechsel sind zwar in dieser Mitteilung nicht enthalten, aber aus einer Reihe anderer Arbeiten geht hervor, daß Hefe die meisten organischen Säuren veratmen kann, so daß also bei diesem Objekt das gleiche Paradoxon vorliegt.

Wie die eingangs ausgeführte Berechnung des SW der oxydativen Essigsäureassimilation zeigte, kann man nicht generell sagen, daß die beim Acetatabbau gewonnene Energie nicht zu Syntheseleistungen verwertet werden kann. Es lag daher nahe, anzunehmen, daß zwar die oxydativ gewonnene Energie verwendet werden kann, aber die organischen Säuren durch eine Sekundärwirkung speziell den Ammoniumeinbau blockieren. Versuche zur Prüfung dieser Frage sind am hiesigen Institut im Gange und haben gezeigt, daß tatsächlich auch bei gleichzeitiger Gabe von Glucose und Essigsäure der Ammoniumeinbau erheblich gegenüber der Probe mit Glucose ohne Essigsäure zurückbleibt. Diese Versuche werden in anderem Zusammenhang demnächst ausführlicher dargestellt werden.

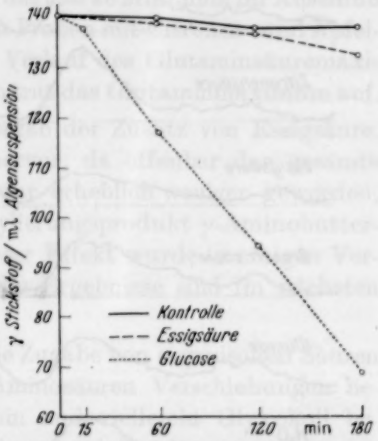


Abb. 14. Abnahme der Ammoniumkonzentration während des Substratumsatzes. p_H 6,0, m/45 Phosphatpuffer, $t = 27°$ C.

Auf die Tatsache, daß organische Säuren, auch wenn sie mehr oder weniger gut veratmet werden können, auf andere Stoffwechselvorgänge stark hemmend wirken können, weist auch schon Myers (1949) hin. Er fand, daß Essig-, Butter- und Capronsäure schon in geringer Konzentration die Photosynthese von *Chlorella* erheblich herabsetzen, und in eigenen Versuchen konnten diese Befunde bestätigt werden.

3. Die freien Aminosäuren und deren Veränderungen nach Zugabe organischer Säuren.

Die im Citronensäurecyclus auftretenden Zwischenprodukte dienen vielfach auch als Bausteine für die Aminosäuresynthese. Es war daher denkbar, daß der Zusatz von organischen Säuren Veränderungen im Bestand an freien Aminosäuren bewirken könnte. Eingehendere Untersuchungen der in *Chlorella* normal vorkommenden freien Aminosäuren liegen von Fowden (1951) vor. Er untersuchte die von Syrett zu den Ammoniumeinbau-Versuchen benützten Algen und stellte fest, daß nach

Ammoniumzugabe die Gesamtmenge an freien Aminosäuren zunimmt, ohne daß qualitative Veränderungen beobachtet werden können. Wird gleichzeitig Glucose geboten, so nimmt die Gesamtmenge an Aminosäuren rasch wieder ab, da unter diesen Bedingungen sofort Eiweiß aufgebaut wird. Tatsächlich konnte der Stickstoff auch wieder in der Eiweißfraktion gefunden werden.

In den eigenen Versuchen wurde durch zweidimensionale Chromatogramme ungefähr der gleiche Bestand an freien Aminosäuren gefunden,

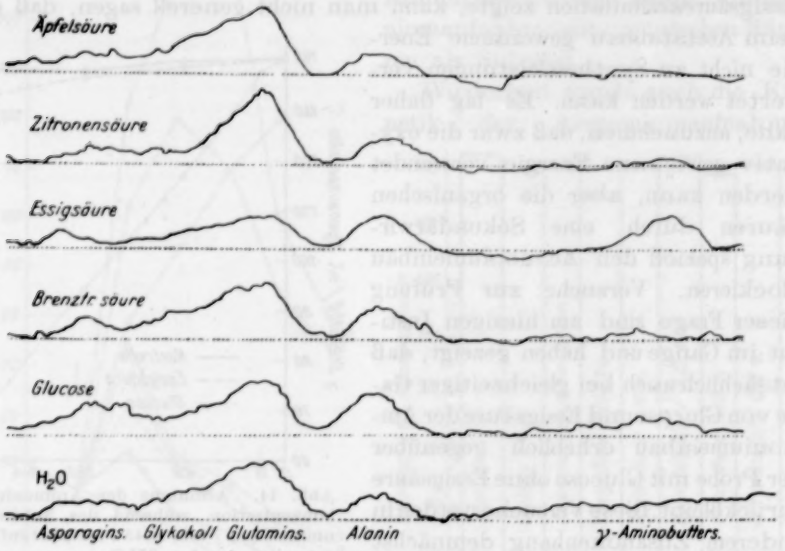


Abb. 15. Extinktionskurven eindimensionaler Chromatogramme der freien Aminosäuren nach 3stündigem Einwirken verschiedener Substrate. Auswertung mit Elphor H.

wie er von Fowden angegeben wurde. Nach Zugabe von Ammonium und organischen Säuren ergaben sich zum Teil sehr deutliche Verschiebungen. Die Versuche wurden so ausgeführt, daß die Algen 3 Std mit Zusatz von Ammonsulfat und 0,1 m der betreffenden Säure geschüttelt und dann nach Abzentrifugieren extrahiert wurden. Eindimensionale Chromatogramme wurden dann auf die oben erwähnte Weise ausgewertet. Die Abb. 15 gibt das Ergebnis eines typischen Versuchs wieder. Natürlich ist die Trennung im eindimensionalen Chromatogramm nicht vollkommen, aber auf Grund von zweidimensional getrennten Parallelproben lassen sich die wesentlichen Maxima eindeutig zuordnen. Prolin, das neben Alanin liegt, gibt einen gelben Farbfleck und erniedrigt die Extinktion unter den Leerwert des Papiers, so daß in den Fällen, in denen Prolin stärker auftritt, im Anschluß an das Alaninmaximum ein unter die Nullinie absinkendes Minimum auftritt. Deutlich unterscheidbar sind in unbehandelten Zellen Asparaginsäure,

Glykokoll, Glutaminsäure, Alanin und sehr schwach Valin (mit γ-Aminobuttersäure isotop) und Leucin.

Nach Zusatz von Glucose + Ammonium tritt neben Asparaginsäure ein zweites Maximum auf, das Glutamin zugeordnet werden konnte. Dies entspricht auch den Beobachtungen Syretts, der eine Zunahme der Amidfraktion fand. Außerdem ist Alanin etwas vermehrt. Weitere Aussagen lassen sich nicht machen. Brenztraubensäure bewirkt ebenso wie alle anderen organischen Säuren eine Zunahme von Prolin. Dies kam auf den ursprünglichen Chromatogrammen sehr deutlich zum Ausdruck und ist in der Kurvendarstellung durch das starke Minimum im Anschluß an Alanin immerhin erkennbar. Bei den Proben mit Citronen- und Äpfelsäure war außerdem noch der steilere Verlauf des Glutaminsäuremaximums auffällig. Bei keiner der 3 Säuren trat das Glutaminmaximum auf.

Einen wirklich auffälligen Effekt ergab der Zusatz von Essigsäure. Asparaginsäure trat besonders klar hervor, da offenbar das gesamte Glutamin fehlte; die Glutaminsäure war erheblich weniger geworden, und statt dessen trat deren Decarboxylierungsprodukt γ-Aminobuttersäure außerordentlich kräftig auf. Dieser Effekt wurde in einigen Versuchen eingehender untersucht, und die Ergebnisse sind im nächsten Abschnitt besprochen.

Abschließend läßt sich sagen, daß die Zugabe von organischen Säuren in der Zusammensetzung der freien Aminosäuren Verschiebungen bewirken, die besonders Prolin, Glutamin und vielleicht Glykokoll betreffen. Alle Effekte sind aber so schwach, daß mit wesentlich verfeinerter Methodik gearbeitet werden muß.

4. Der Einfluß organischer Säuren auf die Glutaminsäuredecarboxylierung.

Als erster fand Okunuki (1937) eine pflanzliche Glutaminsäuredecarboxylase, und zwar in Pollen. Erst Hasse u. Schuhmacher (1950) konnten das Reaktionsprodukt als γ-Aminobuttersäure erkennen. Durch die Entwicklung der papierchromatographischen Methoden wurde in neuerer Zeit diese Verbindung als sehr häufiger Bestandteil des normalen Aminosäurebestandes der Zellen erkannt. So fand sie Reed (1950) in Hefe, Roberts u. Frankel (1951) in Rattenhirn und Thompson u. Mitarb. (1953) konnten ihre allgemeine Verbreitung in pflanzlichen Geweben (Bakterien, Schleimpilzen, niederen und höheren Pilzen, Algen, Farnen, 28 Arten verschiedenster Samenpflanzen) nachweisen.

Das Vorkommen von Glutaminsäuredecarboxylase in verschiedenen Pflanzen (Rüben, Weißkraut, Rettich) und deren Spezifität für Glutaminsäure bzw. deren Dehydratationsprodukt Pyrrolidon-Capronsäure konnten Hasse u. Schuhmacher (1950) zeigen. Wingo u. Awapara (1950) konnten die Glutaminsäuredecarboxylase in Hirnhomogenaten

nachweisen. Die Isolierung und Identifizierung der Wirkgruppe als Pyridoxalphosphat gelang Werle u. Brüninghaus (1950).

Von einer extracellulären Decarboxylierung von Glutaminsäure (GS) in der Kulturflüssigkeit von Pilzen berichtet Kating (1954). Außerdem konnte er nachweisen, daß GS und γ-Aminobuttersäure (AB) normale Transaminierungspartner sind. In neuerer Zeit teilten Giri u. Mitarb. (1953, 1954) mit, daß auch auf nichtenzymatischem Wege AB aus GS entstehen kann. Erhitzt man Alanin und α-Ketoglutarsäure zusammen mit trockener Cellulose, so kann man anschließend GS nachweisen. Gegenwart von Wasser stört die Umwandlung. Erhitzt man auf 95° C, so ist neben GS auch deren Decarboxylierungsprodukt AB nachweisbar. Über 120° werden die Aminosäuren weitgehend zerstört.

In den eigenen Versuchen trat, wie beschrieben, eine Anhäufung von freier AB nach Zugabe von Essigsäure auf, wobei zunächst unklar war, ob dieser Effekt durch Aktivierung der Glutaminsäuredecarboxylase, durch eine Verschiebung von Stoffwechselgleichgewichten oder durch eine nichtenzymatische Reaktion bei der Extraktion zustande kam. Es wurden daher eine Reihe von Versuchen ausgeführt, die diesen merkwürdigen Effekt näher beschreiben und Anhaltspunkte für seine Erklärung liefern sollten.

Zunächst wurde geprüft, ob nicht schon bei der Extraktion durch das Kochen die Decarboxylierung eintreten kann. Dagegen sprach von Anfang an, daß es nur bei den mit Essigsäure behandelten Proben der Fall war. Aber auch das Kochen einer Lösung von Essig- und Glutaminsäure erbrachte keine AB. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß das Ergebnis völlig gleichartig war, gleichgültig ob die Extraktion durch Aufkochen, Einfrieren in flüssiger Luft und langsames Wiederauftauen oder mit 6% Trichloressigsäure vorgenommen wurde. Die Decarboxylierung mußte also in der Zelle erfolgt sein.

Als nächster Punkt wurde die Konzentrationsabhängigkeit und die Notwendigkeit gleichzeitiger Ammoniumzufuhr untersucht. Abb. 16 zeigt das Ergebnis. Die Ammoniumzugabe hat keinen Einfluß auf den Effekt, der stark konzentrationsabhängig ist. 0,006 m Essigsäurekonzentration bewirkt praktisch keine Decarboxylierung. Dagegen ist bei 0,025 m der Effekt deutlich und 0,25 m führt zu beinahe quantitativer Decarboxylierung der GS. Wie die früheren Atmungsmessungen gezeigt haben, wird die schwache Konzentration gut veratmet, während die anderen die Atmung hemmen.

Um zu sehen ob dieser Effekt für Essigsäure spezifisch ist oder ob bei entsprechend hohen Konzentrationen auch andere niedere Carbonsäuren gleichsinnig wirken, wurden auch von diesen Konzentrationsstufungen untersucht. Es ergab sich, daß alle geprüften Säuren wirksam waren. Abb. 17 zeigt ein Chromatogramm von Chlorellaextrakten nach

Zusatz verschiedenster Säuren in einer Konzentration von 0,25 m. Am wirksamsten sind Essigsäure, Milchsäure, Ameisensäure und Propionsäure, die alle zu einer quantitativen Decarboxylierung der GS führen.

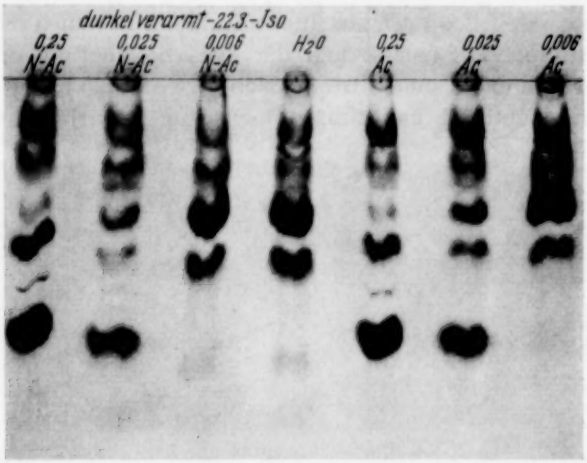


Abb. 16. Eindimensionales Chromatogramm der freien Aminosäuren nach 3stündiger Einwirkung von Essigsäure (rechts) und Essigsäure + Ammonsulfat (links). Essigsäurekonz. jeweils von links nach rechts: 0,25; 0,025 und 0,006 m. Trennungsmittel: Isopropylalkohol-Eisessig-Wasser.

Abb. 17. Eindimensionales Chromatogramm der freien Aminosäuren nach 1,5stündigem Einwirken verschiedener org. Säuren in 0,25 m Lösungen. Trennungsgemisch wie Abb. 16.

Weniger wirksam sind Brenztrauben-, Bernstein- und Weinsäure (letztere in diesem Chromatogramm nicht enthalten), die nicht zu einem quantitativen Verlauf der Reaktion führen, und relativ schwach wirken

Äpfelsäure und Citronensäure. Aus dieser Reihenfolge scheint sich ein gewisser Zusammenhang zwischen Konstitution und Wirksamkeit in dem Sinne zu ergeben, daß mit zunehmender Kettenlänge und Einführung von Doppelbindungen oder Ketogruppen die Wirksamkeit abnimmt. Doch besteht zweifellos auch ein Zusammenhang zwischen der Wirkung auf den Atmungsstoffwechsel und der Decarboxylierung der GS. So sind Malonsäure und Fumarsäure in Mengen von 0,25 m für die Sauerstoffaufnahme optimal und führen nicht zur Decarboxylierung, wie

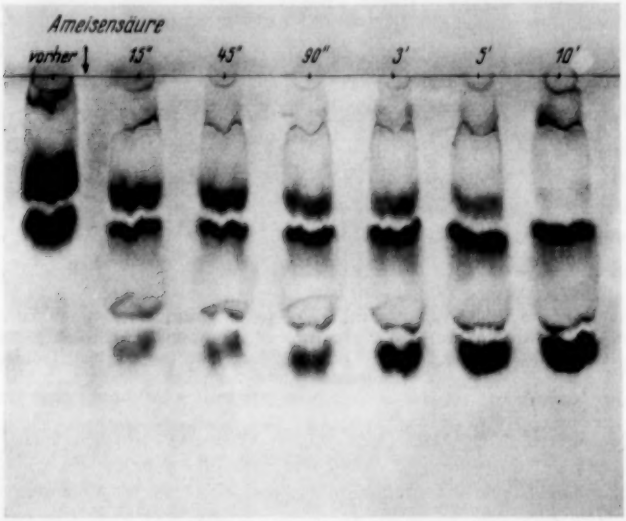


Abb. 18. Eindimensionales Chromatogramm der freien Aminosäuren. Proben verschiedene Zeiten nach Zugabe von Ameisensäure entnommen. Von links nach rechts: Vor Zugabe, nach 15 sec, 45 sec, 90 sec, 3 min, 5 min, 10 min. Trennungsgemisch wie Abb. 16.

Abb. 17 zeigt. Werden aber 0,5 m Lösungen verwandt, so tritt auch hier Decarboxylierung ein, allerdings verläuft sie nicht quantitativ. Auch bei allen anderen Säuren sind die für die Atmung optimalen Konzentrationen nicht oder nur schwach wirksam.

Als nächstes wurde die Geschwindigkeit dieser Decarboxylierungsreaktion untersucht. Dazu wurde zu einer Algensuspension 0,25 m Ameisensäure gegeben und in Abständen von 15 sec bis 10 min Proben entnommen, in vorerhitzte Reagenzgläser gegeben und rasch aufgekocht. Das Ergebnis der chromatographischen Untersuchung zeigt Abb. 18. Schon nach 15 sec ist deutlich AB erkennbar und nach 10 min ist die Reaktion praktisch zu Ende gelaufen. Gleichartigen Reaktionsverlauf gaben auch die Versuche mit anderen Säuren. Allgemein setzt diese Reaktion schneller als die Atmungshemmung ein.

Wenn es sich um eine Aktivierung der Glutaminsäuredecarboxylase handeln würde, dann müßte auch von außen zugesetzte GS laufend in

AB umgewandelt werden. Durch Atmungsmessung (Abb. 19) wurde festgestellt, daß Glutaminsäure von *Chlorella* gut aufgenommen wird, da zugesetzte GS eine starke Atmungsförderung ergibt. Wurden nach Zugabe von GS bzw. GS und Ameisensäure Proben abzentrifugiert, ausgewaschen und extrahiert, so fand sich nur nach Zusatz von Ameisensäure AB in größerer Menge. Während aber ohne GS-Zusatz von außen die Decarboxylierung quantitativ verläuft, fand sich nunmehr auch noch eine große Menge an GS im Extrakt (Abb. 20). Daraus geht hervor, daß zugesetzte GS nicht decarboxyliert werden kann. Dementsprechend konnte manometrisch auch keine CO_2-Entwicklung gemessen werden. Die in der Zelle vorhandene und decarboxylierte Menge an GS ist so gering, daß das entstehende CO_2 manometrisch nur schwer erfaßt werden könnte. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß es in der Zelle sofort zu Ameisensäure hydriert würde, worauf Paech (1950) hinweist. Bei laufender Decarboxylierung von GS müßte aber zweifellos ein Druckanstieg meßbar sein, da Ameisensäure nicht in größerem Umfang gebildet wird, wie chromatographische Untersuchungen zeigten.

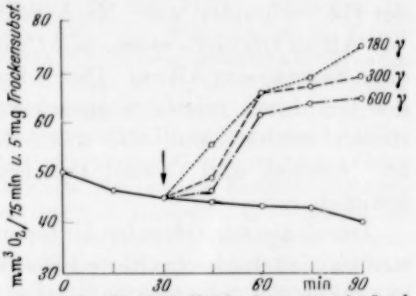


Abb. 19. Sauerstoffaufnahme von je 3 ml Suspension nach Zugabe verschiedener Mengen Glutaminsäure.

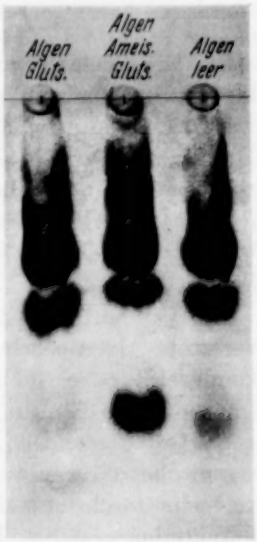


Abb. 20. Eindimensionales Chromatogramm der freien Aminosäuren nach Zugabe von Glutaminsäure (links), Glutaminsäure + Ameisensäure (2. Streifen von links) und ohne Zusatz (rechts).

Weiterhin wurde untersucht, ob die AB-Bildung nur in lebenden oder auch in toten Zellen möglich ist. Dazu wurden die Algen mit sehr starken Giftkonzentrationen abgetötet und dann verschiedene Säuren zugesetzt. Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt: Zu Chlorellasuspensionen in m/45 Phosphatpuffer wurden Gifte gegeben, daß folgende Endkonzentrationen erreicht wurden: Fluorid 0,5 m, Azid 0,25 m, Phenylurethan $^1/_2$ konz. Lösung. Cyanid 0,25 m, Arsenat (in phosphatfreier Lösung) 0,25 m. Nach 10 min wurde 1 ml entnommen und extrahiert, zum Rest Milch- oder Ameisensäure gegeben und nach einer Stunde extrahiert. Die Extrakte wurden gemeinsam chromatographiert.

Die Proben mit Fluorid, Azid und Phenylurethan zeigten nach 10 min, also schon ohne Säurezusatz, deutlich AB, wenn auch noch ein Großteil der GS vorhanden war. Nach Säurezusatz änderte sich das Verhältnis von AB zu GS nicht mehr. Mit Cyanid und Arsenat trat weder mit noch ohne Säurezusatz AB auf. Dieser Befund zeigt, daß die Decarboxylierung der GS durch relativ unspezifische Hemmung des Stoffwechsels gefördert werden kann, aber zweifellos an die Lebenstätigkeit gebunden ist. Arsenat und Cyanid scheinen die GS-Decarboxylase direkt zu hemmen.

Durch die vorstehenden Untersuchungen konnte zwar ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Effekt nur auf einem von der lebenden Zelle unabhängigen, nichtenzymatischen Vorgang beruht, es ist aber auch unwahrscheinlich, daß eine direkte Aktivierung der GS-Decarboxylase durch niedere Carbonsäuren erfolgt. Vermutlich kommt er durch eine unphysiologische Verschiebung von Stoffwechselgleichgewichten zustande, wie sie durch Eingriffe verschiedener Art bewirkt werden können.

Zusammenfassung.

1. Die Beeinflussung der Atmung von *Chlorella* durch eine Reihe niederer Carbonsäuren, die als Intermediärprodukte des Atmungsstoffwechsels bekannt sind, wurde untersucht. Es ergab sich, daß nur die Umsatzraten von Essig- und Brenztraubensäure mit der von Glucose vergleichbar sind, während alle anderen Säuren erheblich langsamer und meist nur in den ersten 30 min eine deutliche Atmungsförderung bewirken. In höheren Konzentrationen wirken praktisch alle geprüften Säuren hemmend.

2. Während nach Zugabe von Glucose stickstoff- und kohlenhydratverarmte Algen sehr rasch große Mengen von Ammonium aufnehmen, kann bei Zugabe von organischen Säuren als Substrat kein Ammonium eingebaut werden, auch wenn die Säuren gut veratmet werden.

3. Der Bestand an freien Aminosäuren zeigt unter der Einwirkung organischer Säuren typische Veränderungen. Besonders auffallend ist die sehr rasch ablaufende Decarboxylierung der Glutaminsäure zu γ-Aminobuttersäure. Dieser Effekt wird besonders von den einfachen Carbonsäuren hervorgerufen und tritt bei atmungshemmenden Konzentrationen auf.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur.

Brüggemann, J., u. K. Drepper: Neue Methode zur Entwicklung von Chromatogrammen. Naturwiss. **39**, 301 (1952). — Cramer, F.: Papierchromatographie. Weinheim 1953. — Dixon, M., and R. Keilin: Manometric Methods. Cambridge

1952. — Eny, D.: Respiration studies on Chlorella. I. Growth experiments with acid intermediates. Plant Physiol. **25**, 478 (1950). — II. Influence of various organic acids on gas exchange. Plant Physiol. **26**, 268 (1951). — Fowden, L.: Amino-acids of certain algae. Nature (Lond.) **167**, 1030 (1951). — Giri, K. V., and G. D. Kalyankar: Nonenzymatic transamination reaction between α-amino-acids and keto-acids. Naturwiss. **40**, 224 (1953). — Giri, K. V., G. D. Kalyankar u. C. S. Vaidyanathan: On the reaction of keto-acids with amino-acids. Naturwiss. **41**, 14 (1954). — Hasse, H., u. R. Schuhmacher: Das Reaktionsprodukt der Decarboxylierung von Glutaminsäure mittels pflanzlicher Decarboxylasen. Chem. Ber. **83**, 2 (1950). — Holzer, H., u. E. Holzer: Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in Chlorella. Chem.Ber. **85**, 655 (1952). — Kandler, O.: Über die Beziehungen zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese. II. Gesteigerter Glucoseeinbau im Licht als Indikator einer lichtabhängigen Phosphorylierung. Z. Naturforsch. **9b**, 625 (1954). — Über den synthetischen Wirkungsgrad in vitro kultivierter Embryonen, Wurzeln und Sprosse. Z. Naturforsch. 8b, 109 (1953). — Kating, H.: Zur Rolle von γ-Aminobuttersäure im Stoffwechsel von Endomycopsis vernalis. Naturwiss. **41**, 188 (1954). — Klein, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1931. — Lange, B.: Kolorimetrische Analyse. Weinheim 1952. — Lynen, F., E. Reichert u. L. Rueff: Zum biologischen Abbau der Essigsäure. VI. „Aktivierte Essigsäure", ihre Isolierung aus Hefe und ihre chemische Natur. Liebigs Ann. **574**, 1 (1951). — Martius, C.: Über die Unterbrechung des Citronensäurecyclus durch Fluoressigsäure. Liebigs Ann. **561**, 227 (1949). — Martius, C., and F. Lynen: Adv. Enzymol. **10**, 167 (1951). — Mothes, K.: Ein Beitrag zur Assimilation stickstoffhaltiger Verbindungen durch Bäckerhefe. Planta (Berl.) **42**, 64 (1953). — Myers, J.: Oxidative assimilation in relation to photosynthesis in Chlorella. J. gen. Physiol. **30**, 217 (1949). — Okunuki, K.: Über ein neues Enzym Glutaminodecarboxylase. Botanic. Mag. **51**, 270 (1937). — Paech, K.: Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin 1950. — Reed, L.: γ-Aminobutyric acid in yeast. J. of Biol. Chem. **183**, 56 (1950). — Roberts, E., and J. Frankel: γ-Aminobutyric acid in mice and rat brain. J. of biol. Chem. **188**, 189 (1951). — Syrett, P. J.: The assimilation of ammonia by nitrogen-starved cells of Chlorella vulgaris. I. The correlation of assimilation with respiration. Ann. of Bot. **17**, 65 (1953). — The assimilation of ammonia to other compounds. Ann. of Bot. **17**, 69 (1953). — Taylor, F. J.: Oxidative assimilation of glucose by Scenedesmus quadricauda. J. of exper. Bot. **1**, 302 (1951). — Thompson, J. F., J. K. Pollard and F. C. Steward: Investigations of nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. III. Plant Physiol. **28**, 401 (1953). — Werle, E., u. S. Brüninghaus: Zur Kenntnis der Cysteinsäure- und der Glutaminsäuredecarboxylase. Biochem. Z. **321**, 492 (1950). — Wieland, Th., and C. Kawerau: Conservation of amino-acid chromatogramms. Nature (Lond.) **168**, 78 (1951). — Wingo, L. H., and R. Awapara: Decarboxylation of glutamic acid by brain. J. of biol. Chem. **187**, 267 (1950).

Privatdoz. Dr. O. Kandler, München, Menzingerstr. 67.

Planta, Bd. 46, S. 70—91 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg.

EXPERIMENTELL ERZEUGTE BASTARDE ZWISCHEN *DRYOPTERIS FILIX-MAS* (L.) SCHOTT UND *D. PALEACEA* (Sw.) C. CHR.

Von

W. Döpp.

Mit 14 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. April 1955.)

Einleitung.

Bastarde zwischen verschiedenen Farnarten sind nur in wenigen Fällen experimentell hergestellt worden. Aus neuester Zeit erwähne ich besonders die Arbeit von Meyer (1952), der *Asplenium*-Arten miteinander gekreuzt hat. Sein schönstes Ergebnis ist wohl die Herstellung des *Asplenium germanicum* aus seinen Elternpflanzen. Bereits 1939 habe ich über selbst hergestellte Bastarde zwischen *Dryopteris Filix-mas* (L.) Schott und einer Gartenform *(var. cristata)* von *D. paleacea* (Sw.) C. Chr.[1] ausführlich berichtet.

Ferner gelang es mir schon in den Jahren 1937—1939, *Dryopteris Filix-mas* und Normalformen von *D. paleacea* vom natürlichen Standort miteinander zu kreuzen. Darüber habe ich 1941 und 1950 eine kurze Mitteilung gemacht. Aus verschiedenen Gründen ist es mir erst jetzt möglich, auf diese Versuche und auf die Bastarde selbst in einer ausführlichen Arbeit einzugehen. Auf dem 8. Internat. Botanikerkongreß in Paris wurde der wesentliche Inhalt dieser Arbeit vorgetragen (Juli 1954).

Material, Technik der Bastardierungsversuche.

Das *Sporenmaterial* von *Dryopteris Filix-mas* verdanke ich dem verstorbenen Herrn A. Lösch in Kirchzarten bei Freiburg i. Br.; es stammt aus dem Zastlertal im Schwarzwald. Von *Dryopteris paleacea* erhielt ich 2 Pflanzen aus der Schweiz von Herrn E. Oberholzer in Samstagern, Kanton Zürich. Die eine, deren Sporen zum ersten Versuch benutzt wurden, war von ihm als var. *disjuncta* Fomin bestimmt worden, die andere, die das Sporenmaterial für den zweiten Versuch lieferte, als var. *insubrica* v. Tavel. Die Blätter dieser beiden Exemplare wie auch die von mir aus ihren Sporen kultivierten Pflanzen zeigen gewisse morphologische Unterschiede (Tabelle 1).

[1] Diese Bezeichnung möchte ich, obwohl vieles für die Benennung *D. paleacea* (Sw.) Hand.-Mazz. (Rothmaler 1945) spricht, beibehalten, bis eine endgültige Entscheidung getroffen ist (vgl. auch Reichling 1953, S. 50).

D. paleacea-Prothallien erzeugen zwar niemals Archegonien, wohl aber Antheridien mit funktionsfähigen Spermatozoiden; sie können also zu Kreuzungsversuchen benutzt werden. Prothallien von *D. paleacea* wurden auf Erde in flachen Blumentöpfen herangezogen. Je ein Topf stand in einem etwa 22 cm breiten und 14 cm hohen zylindrischen

Tabelle 1.

	Dryopteris Filix-mas	Experimentell erzeugter Bastard		Dryopteris paleacea	
		1. Versuch (× var. disjuncta)	2. Versuch (× var. insubrica)	1. Versuch (var. disjuncta)	2. Versuch (var. insubrica)
Sporen (Abb. 12, 13)	durchweg normal ausgebildet; geringe Größenunterschiede	keimfähige Sporen im Durchschnitt größer als bei D. Filix-mas und D. paleacea; sehr zahlreiche fehlgeschlagene oder abnorm gestaltete Sporen; zahlreiche kleine Sporen		Sporen teilweise fehlgeschlagen oder abnorm gestaltet; kleine Sporen vorhanden	
Sporenkeimung (Keimprozent)	85—95	16—41		73	
Winterfestigkeit unter extremen Bedingungen in Marburg/Lahn	winterhart	winterhart		nicht winterhart	weniger winterhart
Blattlänge in cm (maximal)	80	60—72		42	
Blätter	weich, Oberseite matt, Unterseite grün, im Herbst welkend	derb — lederig, Oberseite glänzend, Unterseite graugrün, im Winter häufig grün bleibend		derb — lederig, Oberseite glänzend, Unterseite graugrün, im Winter häufig grün bleibend	
Schuppen	weniger dicht als bei D. paleacea, hellbraun	sehr dicht stehend, braun bis schwarzbraun		sehr dicht stehend, braun bis schwarzbraun	
Blattfiedern (Segmente 1. Ordnung)	untere Fiedern meist alternierend, schief ansitzend	untere Fiedern häufig fast gegenständig, senkrecht ansitzend		untere Fiedern fast gegenständig, senkrecht ansitzend	
Fiederchen (Segmente 2. Ordnung; Abb. 1)	gezähnt	fast glatt	schwach gezähnt	glatt oder fast glatt	schwach gezähnt
	Seitenränder meist konvergent; spitzenwärts verschmälert-abgerundet	Seitenränder meist parallel; Spitzenteil (Apex) abgestumpft-gerundet		Seitenränder meist parallel; Spitzenteil abgestumpft-abgerundet	

Tabelle 1. (Fortsetzung[1].)

	Dryopteris Filix-mas	Experimentell erzeugter Bastard		Dryopteris paleacea	
		1. Versuch (× var. disjuncta)	2. Versuch (× var. insubrica)	1. Versuch (var. disjuncta)	2. Versuch (var. insubrica)
Nervatur	undeutlich	ziemlich deutlich		deutlich	
Indusium (Abb. 2)	weich, flach, tellerförmig, den Sorus nicht mit den Rändern umgreifend;	ziemlich derb; Rand unter den Sorus umgebogen		derb; Rand unter den Sorus umgebogen	
	bei der Reife kraus werdend, zusammenschrumpfend	Rand bei der Reife zurückgedrängt		Form bei der Reife beibehalten	
Chromosomenzahl	n = 82	164= 82+82	205= 82+123	82	123

Glasgefäß, das einen aufgeschliffenen durchbohrten Deckel mit Watteverschluß besaß. Wenn die Prothallien genügend Antheridien gebildet hatten, wurden sie mit Gaze- oder Tüllstoff überdeckt. Darauf setzte ich große, gut entwickelte Prothallien von *D. Filix-mas*, deren hinterer Abschnitt, auf dem meistens die Antheridien sitzen, weggeschnitten war. In das Glasgefäß wurde Wasser eingegossen; es drang durch das Loch des Topfes in die Erde ein, bis es die Prothallien von *D. Filix-mas* erreichte. So wurde die Kultur einen Tag lang gewässert und dann die Wässerung im Abstand von 3—5 Tagen wiederholt. Zwischendurch wurden die Prothallien einige Male mit einer Pflanzenspritze fein überbraust. Nach einigen Wochen wurde der Versuch abgebrochen. Die etwa 300 *D. Filix-mas*-Prothallien, die zum Versuch gedient hatten, prüfte ich nun mikroskopisch auf das Vorhandensein von Antheridien. Waren solche vorhanden, so wurden die betreffenden Prothallien ausgeschieden, da bei ihnen die Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung durch arteigene Spermatozoiden besonders groß war. Die übrigen Prothallien wurden ebenso wie die auf ihnen entstehenden Keimpflanzen auf Erde weiter kultiviert. Nicht alle sich entwickelnden Pflanzen waren Bastarde, sondern viele auch reine *D. Filix-mas*. Zum Teil mag dies dadurch zu erklären sein, daß mitunter Antheridien übersehen wurden. Im ganzen erhielt ich aus den etwa 300 Prothallien eines Versuches, wie sich im Verlauf der weiteren Entwicklung zeigte, etwa 20 Bastardpflanzen. Der erste Versuch wurde 1937 angesetzt, der zweite im Jahre 1939.

[1] Es soll hier nicht versucht werden, eine vollständige Diagnose der Art *D. paleacea* zu geben, sondern es sind nur die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale der beiden zu den Versuchen benutzten *D. paleacea*-Formen aufgeführt.

Beschreibung der Bastarde.

Die Bastarde unterscheiden sich äußerlich nur sehr wenig von *D. paleacea*, so daß es oft schwierig ist, die beiderseitigen Merkmale

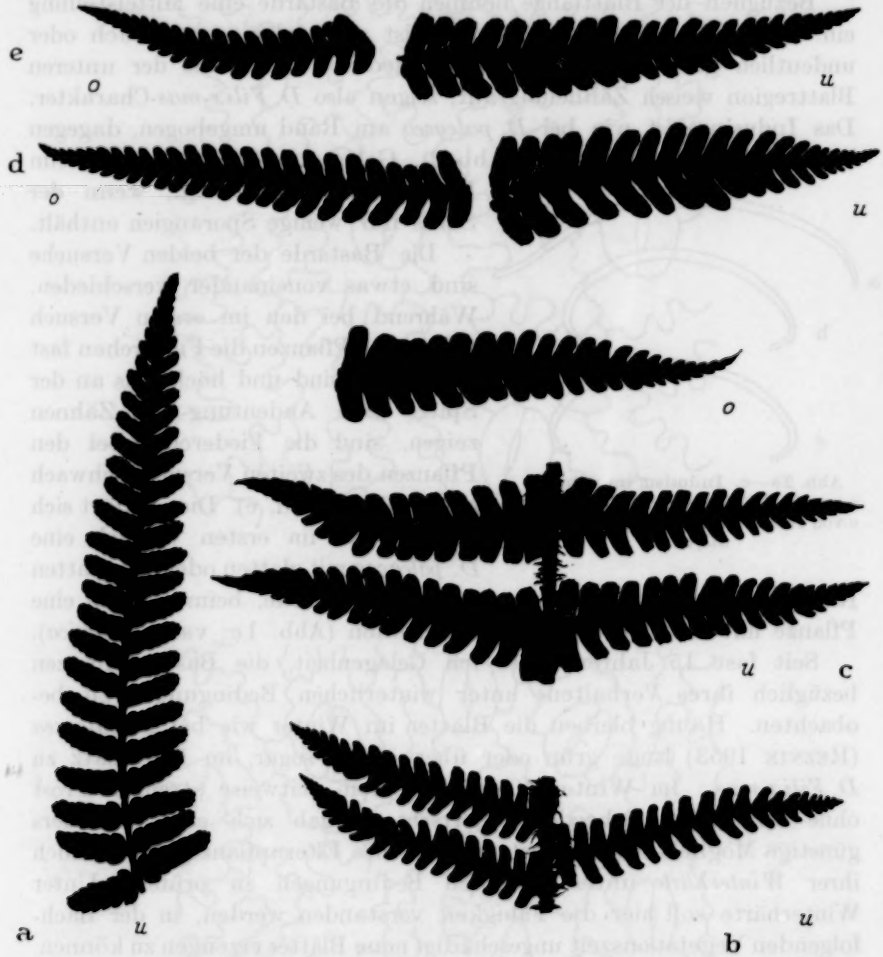


Abb. 1 a—e. Fiederblättchen aus der unteren (*u*) und mittleren bis oberen (*o*) Blattregion, a von *D. Filix-mas*, b von *D. paleacea* var. *disjuncta*, c von *D. paleacea* var. *insubrica*, d von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *disjuncta*, e von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *insubrica*. $^2/_3$ nat. Gr.

voneinander abzugrenzen. Zuweilen glaubt man, reine *D. paleacea* vor sich zu haben. Bei näherer Betrachtung lassen sie jedoch, wenn auch oft nur undeutlich, Merkmale von *D. Filix-mas* erkennen. In Tabelle 1 ist der Versuch gemacht, die wichtigsten Merkmale der Bastarde und der Elternpflanzen zusammenzustellen. Dabei ist zu beachten, daß

D. paleacea in Kultur vielfach nicht die typische Ausbildung ihrer Merkmale zeigt. So stehen z. B. die Schuppen bei kultivierten Pflanzen sehr viel weniger dicht als bei Pflanzen vom natürlichen Standort.

Bezüglich der Blattlänge nehmen die Bastarde eine Mittelstellung ein. Der Seitenrand der Fiederchen ist glatt oder nur schwach oder undeutlich gezähnt. Besonders die Fiederblättchen aus der unteren Blattregion weisen Zähnelung auf, zeigen also *D. Filix-mas*-Charakter. Das Indusium ist wie bei *D. paleacea* am Rand umgebogen, dagegen bei *D. Filix-mas* tellerförmig (Abb. 2). Gelegentlich kann es auch beim Bastard tellerförmig sein, wenn der Sorus nur wenige Sporangien enthält.

Abb. 2a—c. Indusium im Schnitt, a von *D. Filix-mas*, b von *D. paleacea*, c von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *disjuncta*.

Die Bastarde der beiden Versuche sind etwas voneinander verschieden. Während bei den im ersten Versuch erhaltenen Pflanzen die Fiederchen fast ganzrandig sind und höchstens an der Spitze eine Andeutung von Zähnen zeigen, sind die Fiederchen bei den Pflanzen des zweiten Versuchs schwach gezähnt (Abb. 1d, e). Dies erklärt sich daraus, daß im ersten Versuch eine *D. paleacea* mit glatten oder fast glatten Rändern (Abb. 1b; var. *disjuncta*) benutzt wurde, beim zweiten eine Pflanze mit schwach ausgebildeten Zähnen (Abb. 1c; var. *insubrica*).

Seit fast 15 Jahren hatte ich Gelegenheit, die Bastardpflanzen bezüglich ihres Verhaltens unter winterlichen Bedingungen zu beobachten. Häufig bleiben die Blätter im Winter wie bei *D. paleacea* (Reznik 1953) lange grün oder überwintern sogar, im Gegensatz zu *D. Filix-mas*. Im Winter 1953/54, in dem zeitweise strenger Frost ohne schützende Scheedecke herrschte, ergab sich eine besonders günstige Möglichkeit, die Bastarde und ihre Elternpflanzen hinsichtlich ihrer *Winterhärte* unter extremen Bedingungen zu prüfen. Unter Winterhärte soll hier die Fähigkeit verstanden werden, in der nachfolgenden Vegetationszeit ungeschädigt neue Blätter erzeugen zu können. Die Pflanzen befanden sich, zum Teil ungeschützt, im Freiland oder in Töpfen, ebenfalls im Freien. *D. Filix-mas* war unter diesen Bedingungen durchaus winterhart, ebenso die Bastarde und zwar in beiden Versuchen, obwohl die eine der beiden *D. paleacea*-Formen sich weniger, die andere als überhaupt nicht winterfest erwies (Tabelle 1).

Abb. 3 zeigt Epidermiszellen der Blattunterseite des Bastardes und seiner Eltern. Diese sind beim Bastard wesentlich größer als bei *D. paleacea*. Das gleiche gilt für die Länge der Schließzellen. Die mittlere Länge derselben beträgt bei *D. Filix-mas* 61,2 μ, bei *D. paleacea* var.

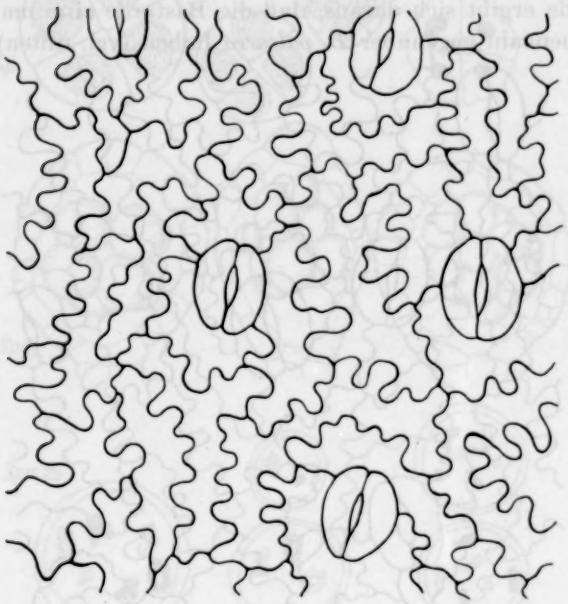


Abb. 3a.

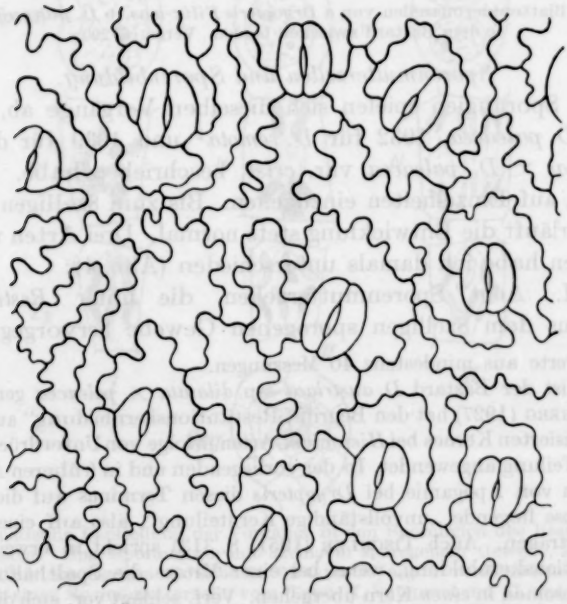


Abb. 3b.

disjuncta 37,2 μ, bei dem Bastard 57,9 μ[1]. Die Erklärung für diese Unterschiede ergibt sich daraus, daß die Bastarde eine um 82 erhöhte Chromosomenzahl gegenüber *D. paleacea* haben (vgl. unten).

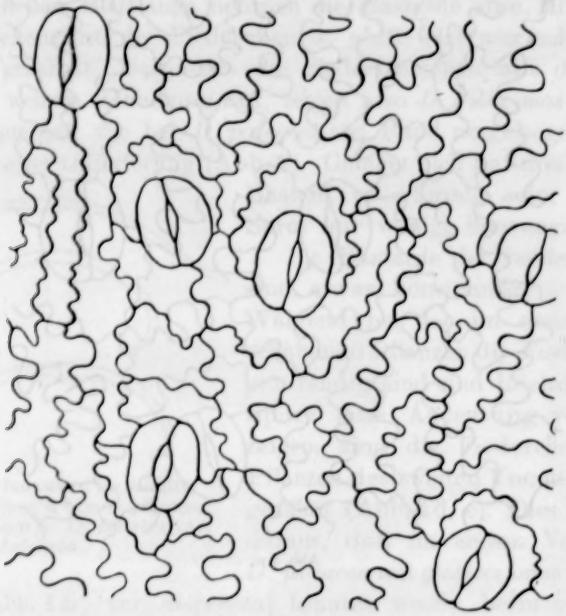


Abb. 3c

Abb. 3a—c. Blattepidermiszellen von a *Dryopteris Filix-mas*, b *D. paleacea* var. *disjuncta*, c dem Bastard zwischen beiden. Vergr. ca. 200×.

Sporenmutterzellen und Sporenbildung.

In den Sporangien spielen sich dieselben Vorgänge ab, wie ich sie 1939 für *D. paleacea*, 1932 für *D. remota*[2] und 1939 für den Bastard *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *crist.* beschrieben habe. Es erübrigt sich daher, auf Einzelheiten einzugehen. Bis zum 8zelligen sporogenen Gewebe verläuft die Entwicklung stets normal. Drei Arten von Sporenmutterzellen habe ich damals unterschieden (Abb. 4):

Typus I. Acht Sporenmutterzellen, die unter *Restitutionskernbildung*[3] aus dem 8zelligen sporogenen Gewebe hervorgegangen sind.

[1] Mittelwerte aus mindestens 40 Messungen.

[2] Damit ist der Bastard *D. austriaca* ssp. *dilatata* × *paleacea* gemeint.

[3] Rosenberg (1927) hat den Begriff „Restitutionskernbildung" auf die Bildung eines diploidisierten Kernes bei *Hieracium*-Arten infolge von Unterdrückung der *heterotypischen* Teilung angewendet. In der vorliegenden und in früheren Arbeiten habe ich in Fällen von Apogamie bei *Dryopteris* diesen Terminus auf die unmittelbar vor der Meiose liegende „unvollständige Kernteilung", also auf eine abgeänderte *Mitose*, übertragen. Auch Tischler (1951, S. 313) spricht in erweitertem Sinne von Restitutionskernbildung, wenn bei einer Mitose die Spalthälften der Metaphasechromosomen in *einen* Kern übergehen. Verf. schlägt vor, sich dieser Begriffserweiterung anzuschließen.

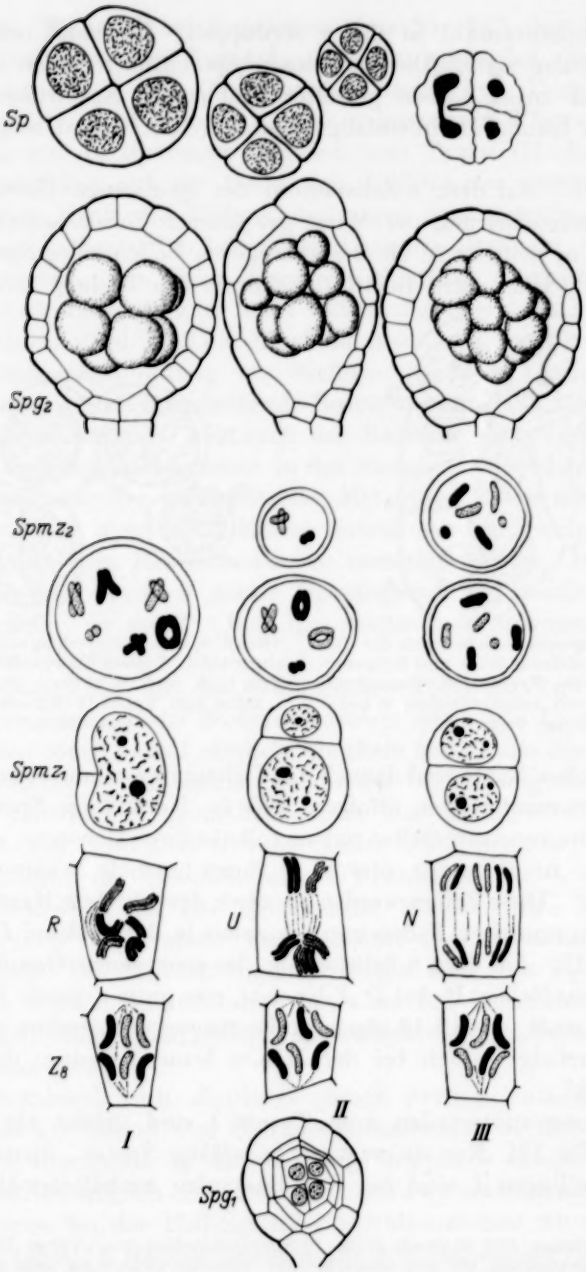


Abb. 4. Schematische Darstellung der Vorgänge in den Sporangien des Bastards *D. Filix-mas* × *D. paleacea*. Spg_1 Sporangium mit 8zelligem sporogenem Gewebe, Z_8 Einzelzellen aus dem 8zelligen sporogenen Gewebe in Metaphase aus 3 verschiedenen Sporangien, *I* Entwicklung einer Sporenmutterzelle vom Typus I, entsprechend II und III. *R* Restitutionskernteilung; *U* unregelmäßige Kernteilung, durch die in Verbindung mit unregel-

Ihre Chromosomenzahl ist daher verdoppelt. Es findet normale Reduktionsteilung statt. Die aus diesen Sporenmutterzellen gebildeten Sporen sind meist *normal* gestaltet und *fertil*. Auf frühen Stadien findet man häufig unvollständige Wände (Abb. 5) und eingeschnürte Kerne.

Typus II. Auf dem 8-Zellstadium des sporogenen Gewebes kann infolge Durchschnürung der Masse gespaltener Chromosomen in einer bis mehreren, seltener in allen 8 sporogenen Zellen eines Sporangiums statt der Bildung eines Restitutionskernes die Bildung zweier meist

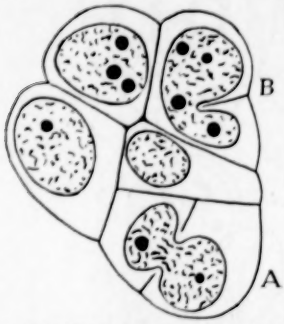


Abb. 5. Sporogenes Gewebe nach der Restitutionskernbildung. Bei A und B Sporenmutterzellen vom Typus I mit eingeschnürten Kernen und unvollständiger Wandbildung. Vergr. 850×.

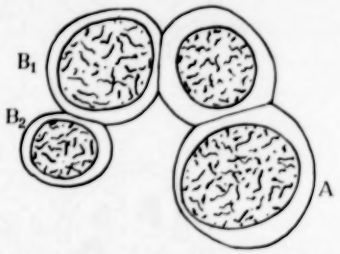


Abb. 6. Sporenmutterzellen, schon fast ganz abgerundet. A große Sporenmutterzelle vom Typ I, B_1 und B_2 kleinere Sporenmutterzellen vom Typus II (Schwesterzellen). Vergr. 680×.

ungleich großer Kerne und danach die Teilung in zwei meist verschieden große Sporenmutterzellen erfolgen (Abb 6). Keimfähige Sporen gehen aus diesen Sporenmutterzellen mit unvollständigen Genomen, soweit mir bekannt ist, nicht hervor, obwohl in ihnen normale Diakinese zu beobachten ist. Diese Zellen werden in etwa der gleichen Häufigkeit gebildet wie in sonstigen Fällen von Apogamie in der Gattung *Dryopteris*.

Typus III. Auf dem 8-Zellstadium des sporogenen Gewebes findet wie im Normalfall, z. B. bei *D. Filix-mas*, eine ganz normale Kern- und Zellteilung statt, so daß 16 gleich große Sporenmutterzellen entstehen. In diesen erfolgt jedoch bei der Meiose keine Paarung; die Sporen schlagen fehl.

Die Sporenmutterzellen vom Typus I sind größer als die vom Typus II oder III. *Nur* sie erzeugen *keimfähige Sporen*. Sporenmutterzellen vom Typus I sind bei den Bastarden verhältnismäßig selten

mäßiger Zellteilung zwei ungleich große Sporenmutterzellen vom Typus II entstehen; *N* normale Kernteilung, die mit nachfolgender normaler Zellteilung zwei gleich große Sporenmutterzellen vom Typus III liefert. *Spmz*$_1$ junge Sporenmutterzellen, *Spmz*$_2$ ältere Sporenmutterzellen in Diakinese, bei *I* und *II* mit Gemini, bei *III* nur einige Chromosomen gepaart. *Spg*$_2$ Sporangien mit abgerundeten Sporenmutterzellen, *Sp* Sporentetraden. In den sporogenen Zellen sind 6 Chromosomen angenommen, von denen die 3 schwarzgezeichneten von *D. Filix-mas*, die punktierten von *D. paleacea* stammen mögen.

anzutreffen. Während bei *D. paleacea* etwa 30—40% der Sporangien Sporenmutterzellen vom Typus I aufweisen, zeigen bei den Bastardpflanzen nur etwa 2—5% der Sporangien diesen Typ. Dagegen ist bei den Bastarden im Gegensatz zu *D. paleacea* ein Überwiegen von Sporangien mit 16 Sporenmutterzellen vom Typus III festzustellen. Das ist zweifellos auf die Gene von *D. Filix-mas* zurückzuführen. Diese fördern somit die Bildung desjenigen Sporangientyps, in dem aus den bei Artbastarden bekannten Gründen (Renner 1929) keine Paarung eintritt. Die Folge davon ist Sterilität dieser Sporangien. Daher sind die Bastarde zwar nicht vollständig, aber doch bis zu einem gewissen Grade steril. Daß die Sterilität nicht vollkommen ist, ist auf die Restitutionskernbildung im 8zelligen Gewebe zurückzuführen. Diese hat daher eine entscheidende Bedeutung im Entwicklungsablauf sowohl von *D. paleacea* wie auch der Bastarde. Sie bedingt einen normalen Paarungsmechanismus in der Meiosis. Die Spalthälften eines jeden Chromosoms der vormeiotischen Metaphase liefern nämlich einen Geminus, da sie nicht auf 2 Kerne verteilt werden, sondern in *einem* Kern, nämlich dem Restitutionskern, vereinigt bleiben. Der Bastard *Asplenium germanicum*, in dessen Sporangien keine Restitutionskernbildung erfolgt, ist steril[1]. Bei ihm werden nur Sporenmutterzellen vom Typus III gebildet.

Als weitere Folge aus den cytologischen Befunden ergibt sich, daß die *Nachkommenschaft* der Bastarde *konstant* sein muß. In den Sporenmutterzellen vom Typus I nämlich, die allein keimfähige Sporen liefern, trennen sich in der Metaphase der ersten Reifeteilung die zu einem Geminus vereinigten Spalthälften eines und desselben Chromosoms. Somit hat also, soweit es sich beurteilen läßt, die Restitutionskernbildung mitsamt der anschließenden 1. Reifeteilung im Grunde keinen anderen Endeffekt als eine gewöhnliche Mitose. Eine Aufspaltung findet demnach nicht statt. Das bedeutet aber *Konstanz der Nachkommenschaft*. Die Beobachtungen bestätigen dies. Die F_2-Generation, die ich in beiden Versuchsserien mit über 100 Individuen heranzog, ist unter sich vollkommen gleichförmig und gleicht ganz der entsprechenden F_1-Generation.

Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß eine gewisse *Variabilität* auf Grund von Chromosomen*elimination*, die ich in allen Fällen von Apogamie in der Gattung *Dryopteris* öfters beobachtet habe, durchaus möglich erscheint. Zuweilen sondern sich nämlich einige Chromosomen bei der Bildung des Restitutionskernes ab und werden resorbiert (Abb. 7). Jedoch könnten nur sehr eingehende Untersuchungen über diesen Punkt Klarheit verschaffen. Theoretisch wäre ferner

[1] Ausnahmefälle, d. h. die Möglichkeit, daß gelegentlich einzelne keimfähige Sporen bei diesem Bastard gebildet werden, erscheinen nicht ganz ausgeschlossen.

denkbar, daß in sehr seltenen Fällen auch einmal aus den Sporenmutterzellen der Typen II oder III keimfähige Sporen hervorgingen.

An Stelle der zweiten Reifeteilung kann sowohl gelegentlich beim Typus I wie noch häufiger beim Typus III eine Restitutionskernbildung erfolgen. In diesem Fall können Sporen von unregelmäßiger Gestalt mit einer oder zwei Einschnürungen (Abb. 12, E) entstehen. Soweit meine Beobachtungen reichen, sind aber auch solche aus Sporenmutterzellen vom Typus III hervorgegangene Sporen nicht keimfähig.

In den großen Sporenmutterzellen wurden bei der ersten Versuchsserie etwa 160, bei der zweiten etwa 200 Chromosomen gezählt (Abb. 9 und 10). Die genauen Zahlen sind gemäß den Angaben von Manton (1939, 1950; vgl. auch unten) 164 und 205. Bei den zum Bastardierungsversuch von mir benutzten elterlichen *D. paleacea*-

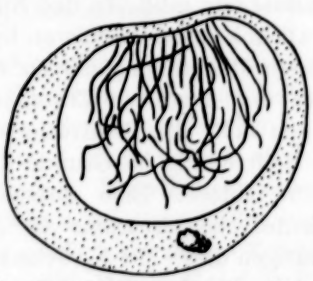


Abb. 7. Sporenmutterzelle vom Typus I mit Chromosomenelimination. Vergr. 2050×.

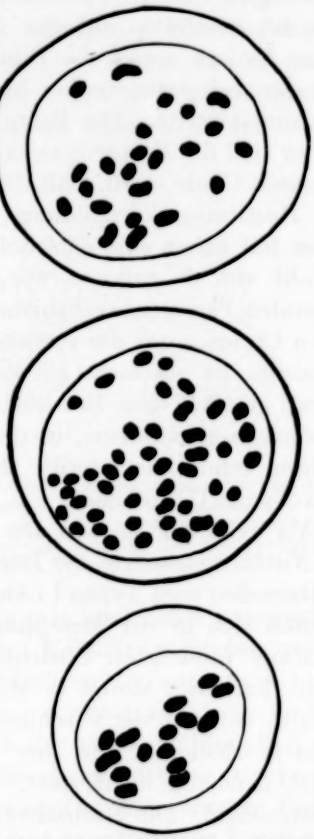


Abb. 8. Sporenmutterzelle in 3 Schnitten von *D. paleacea* var. *disjuncta* (Typus III) mit etwa 80 Univalenten (23 + 45 + 15). Vergr. 2050×.

Pflanzen zählte ich etwa 80 (Abb. 8, *D. paleacea* var. *disjuncta*[1]) bzw. etwa 120 (*D. paleacea* var. *insubrica*) Chromosomen (vgl. auch Knaben 1948),

[1] In meiner 1939 erschienenen Arbeit gab ich auf S. 487 für *D. paleacea* var. *disjuncta* etwa 120 Chromosomen an. Die damals untersuchte Pflanze habe ich jedoch nicht für die Bastardierungsversuche benutzt, sondern eine andere, die ebenfalls var. *disjuncta* war und ebenfalls aus der Schweiz stammte, mit etwa 80 Chr. Diese Varietät kommt demnach in der Schweiz in diploidem und triploidem Zustand vor. Manton bezeichnet (1950, S. 59) bezüglich des von ihr geprüften Schweizer Materials die var. *disjuncta* als diploid, die anderen Formen außer var. *punctata* als triploid. Als triploide Schweizer Form nennt sie auch var. *insubrica*; diese hat sie übrigens in Wales im diploiden Zustand gefunden.

wobei als genaue Zahlen zweifellos 82 und 123 anzunehmen sind. Nach MANTON (1950) ist als Grundzahl in der Gattung *Dryopteris* 41 anzusehen, sodaß also 82 als Diploid-, 123 als Triploidzahl zu gelten hat.

In den Sporenmutterzellen vom Typus III tritt verhältnismäßig häufig Paarung ein, obwohl eine Restitutionskernbildung nicht voraus-

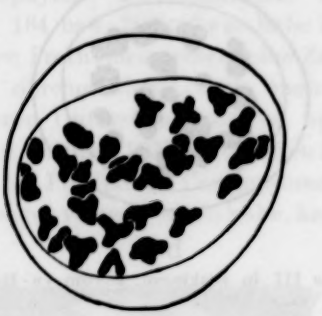


Abb. 9. Sporenmutterzelle (Typus I) in 2 Schnitten von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *disjuncta* (1. Versuch) in Diakinese (4n-Bastard). 30 + 136 = 166 Gemini. Fix. Carnoy, Färbung mit Hämatoxylin-Heidenhain. Vergr. 2050×.

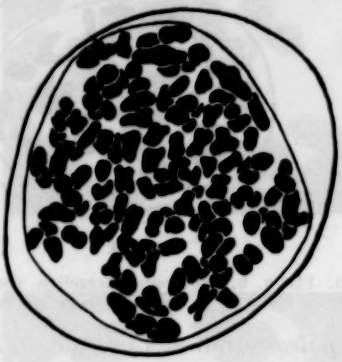


Abb. 10. Sporenmutterzelle in 2 Schnitten von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *insubrica* (2. Versuch) in Diakinese (5n-Bastard). 73 + 125 = 198 Gemini. Fix. Carnoy, Färbung mit Hämatoxylin-Heidenhain. Vergr. 2050×.

gegangen ist. Bei den pentaploiden Bastarden ist diese Paarung häufiger als bei den tetraploiden (Abb. 11). Ich möchte dies mit der Annahme erklären, daß in der triploiden elterlichen *D. paleacea*-Pflanze eine Chromosomengarnitur von *D. Filix-mas* oder ein der *D. Filix-mas* nahe verwandtes Genom vorliegt. Zwar ist die in Mitteleuropa vorkommende *D. Filix-mas*, soweit bisher bekannt, mit ihren 164 Chromosomen tetraploid. Miss MANTON hat jedoch gezeigt, daß in Großbritannien eine 82chromosomige, *D. Filix-mas* nahestehende Art vorkommt, nämlich *D. abbreviata* (LAM. et DC) NEWMAN (= *Lastrea propinqua* WOLLASTON). Von verschiedenen Autoren (TH. MOORE, E.

Newman) wurde diese Art als Varietät von *D. Filix-mas* angesehen. Es wäre auch denkbar, daß *D. Filix-mas* selbst auch in einer 82chromosomigen Form vorkommt oder wenigstens früher existiert hat. Die 123chromosomige *D. paleacea* dürfte also aus einer Kreuzung von

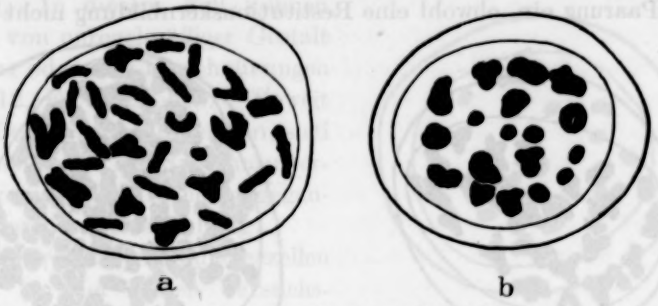


Abb. 11a u. b. Sporenmutterzellen vom Typus III in Diakinese, a vom 4n-Bastard, b vom 5n-Bastard. Vergr. 2050×.

D. paleacea mit 82 Chr. und *D. Filix-mas* oder einer nahestehenden Art mit 41 Chr. im Gametophyten entstanden sein. Auf Grund der Befunde Mantons und eigener Ergebnisse möchte ich meine frühere Vermutung (1939, 1950), die Grundzahl betrage 60—65, fallen lassen.

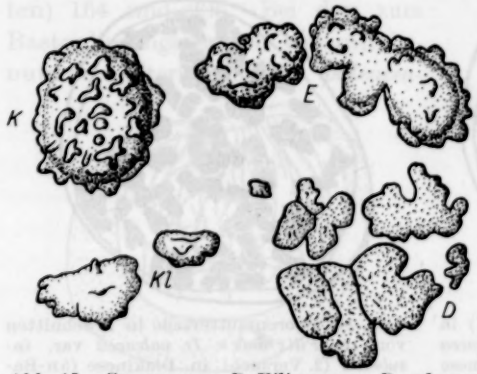


Abb. 12. Sporen von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *insubrica*. *K* keimfähige Spore, *E* Sporen mit „Einschnürungen", Kl kleine, nicht keimfähige Sporen, *D* degenerierter Sporangieninhalt. Vergr. 265×.

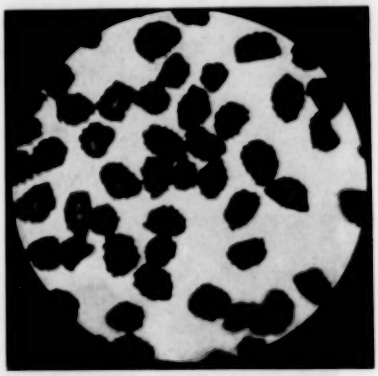
Das *Sporenmaterial* der Bastarde zeigt zahlreiche fehlgeschlagene Sporen und erhebliche Größenunterschiede (Abb. 12, 13; Tabelle 2). Mit zunehmender Chromosomenzahl werden die Maximalwerte größer; dagegen sinkt der Mittelwert bei dem pentaploiden Bastard wegen der hier besonders hohen Zahl kleiner Sporen beträchtlich ab.

Tabelle 2.

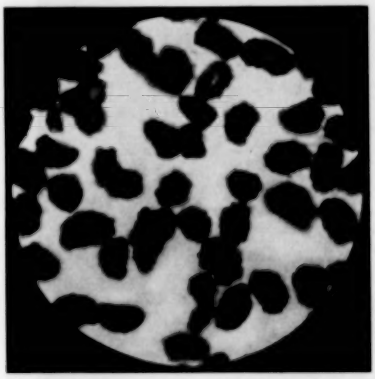
Sporen von	Mittlere Länge (je 50 Messungen) μ	Extremwerte μ	Chromosomenzahl
D. Filix-mas	52,0 ± 4,2	39,9 — 57,0	2n = 82
D. paleacea (var. *disjuncta*)	54,6 ± 5,7	22,8 — 68,4	2n = 82
D. paleacea (var. *insubrica*)	69,4 ± 6,3	28,5 — 79,8	3n = 123
D. Filix-mas × *D. paleacea* var. *disjuncta*	73,5 ± 11,5	17,1 — 91,2	4n = 164
D. Filix-mas × *D. paleacea* var. *insubrica*	56,5 ± 17,6	21,0 — 114,0	5n = 205

Prothallien und Sporophytbildung.

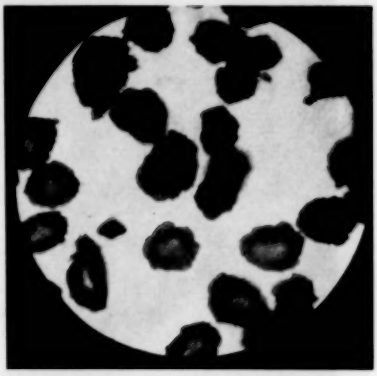
Die Chromosomenzahl der Prothallien der Bastarde, die infolge der Restitutionskernbildung mit der der Sporophyten übereinstimmt, beträgt 164 bzw. 205. Zwar habe ich an den Prothallien selbst keine Zählung durchgeführt; nach meinen früheren Untersuchungen an apogamen Farnen (1932), bei denen ich auch an Prothallien Chromosomenzählungen vorgenommen habe, kann



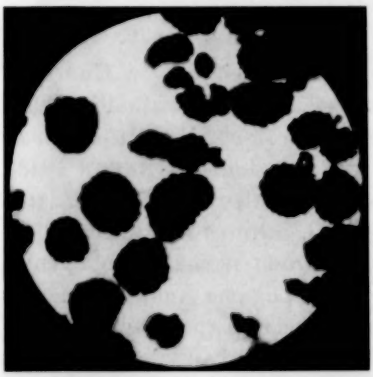
a



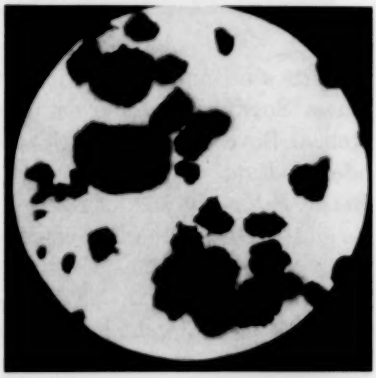
b



c



d



e

Abb. 13a—e. Sporen, a von *Dryopteris Filix-mas*, b von *D. paleacea* var. *disjuncta*, c von *D. paleacea* var. *insubrica*, d von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *disjuncta*, e von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *insubrica*. Vergr. 113×.

für mich kein Zweifel bestehen, daß auch bei den Bastarden die Chromosomenzahl im Gametophyten und im Sporophyten übereinstimmt. Demgegenüber haben die Prothallien von *D. Filix-mas* nur 82, die von *D. paleacea* 82 bzw. 123 Chromosomen. Die erhöhte Chromosomenzahl der Bastardprothallien bedingt Vergrößerung der Zellen eggenüber den Prothallien der elterlichen Arten (Abb. 14). Die Pro-

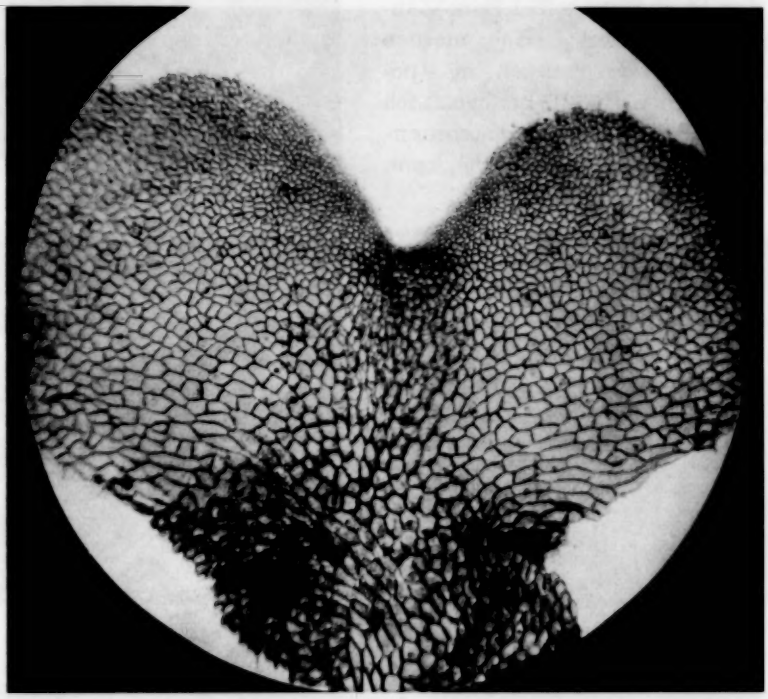


Abb. 14 a.

thallien sind am Rande vielfach gezackt, da die einzelligen Haare auf einem Sockel von einer bis mehreren gewöhnlichen Prothallienzellen stehen. Sie erinnern dadurch an Prothallien von *Asplenium septentrionale* oder *A. Ruta-muraria*, ebenso wie die von *D. paleacea* (Knaben 1948). Bei *D. Filix-mas* ist der Rand — abgesehen von den einzelligen Haaren — glatt. Die Prothallien erzeugen wie bei *D. paleacea* nur Antheridien; unter vielen Tausenden von Prothallien wurden niemals Archegonien beobachtet. Die Sporophyten entstehen als apogame Auswüchse.

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß in Kultur bei den apogamen Bastardprothallien Sporophyten schon in großer Zahl vorhanden sind, wenn bei den Prothallien der sexuellen Elternpflanze *D. Filix-mas* in mehreren Fällen trotz günstigster Feuchtigkeitszufuhr durch Bespritzen noch keine einzige Keimpflanze gebildet worden ist.

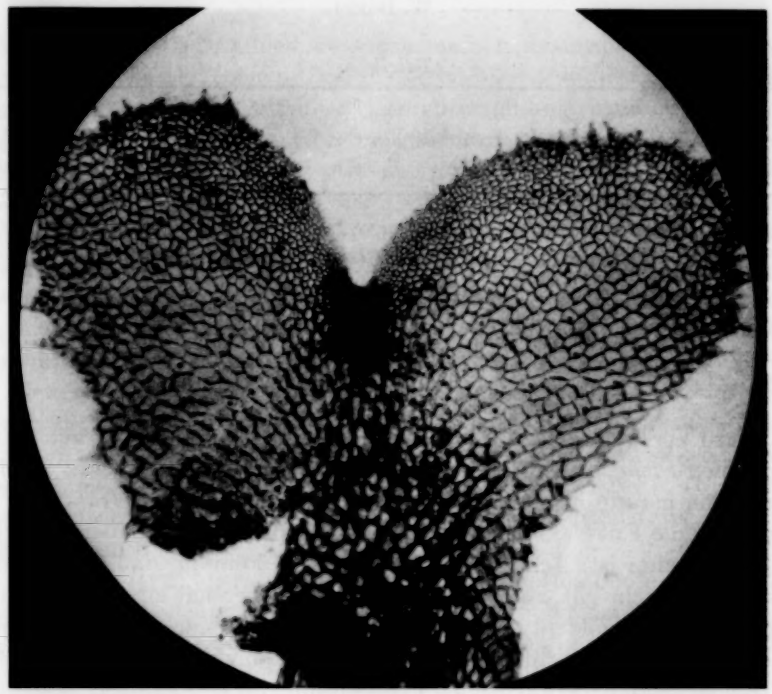


Abb. 14 b.

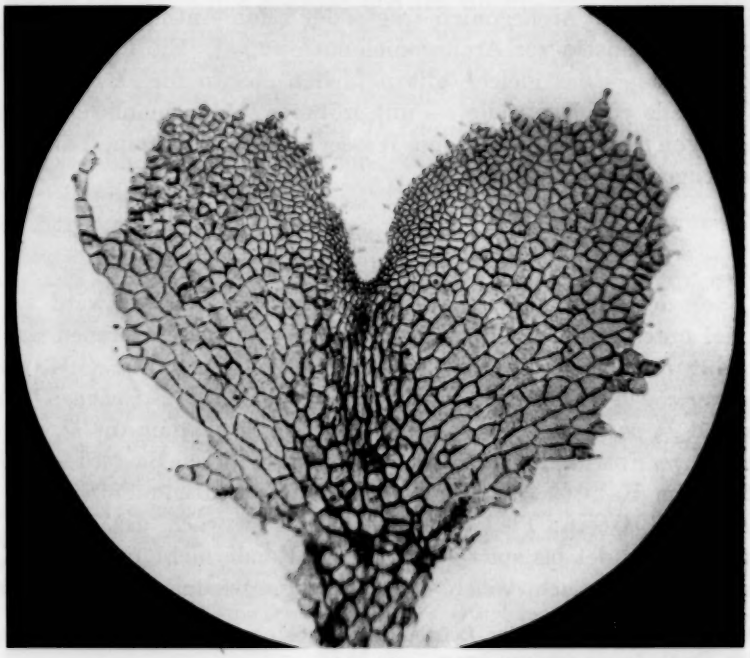


Abb. 14 c.

Abb. 14 a—c. Prothallien, a von *D. Filix-mas*, b von *D. paleacea* var. *disjuncta*, c von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* var. *disjuncta*. Vergr. 29 ×.

Tabelle 3.

	Auf Agar-Agar kultiverte Prothallien von	Ungefähres Alter in Monaten	Zahl der Prothallien	Zahl der Pflänzchen
Aussaaten	*Dryopteris Filix-mas* × *D. paleacea*, 1. Versuch	$2^1/_2$	>100	30
	Dryopteris Filix-mas × *D. paleacea*, 2. Versuch	$2^1/_2$	>100	22
	Dryopteris Filix-mas	3	>100	0
	Dryopteris Filix-mas	7	etwa 150	0
Verpflanzte Proth.	*Dryopteris Filix-mas* × *D. paleacea*	11	30	15
	Dryopteris Filix-mas	11	35	0

Diese Versuche zeigen, daß, entsprechend wie frühere Versuche mit apogamen *Dryopteris*-Formen (Döpp 1939, 1950) gezeigt haben, bei den Bastarden gerade infolge der Apogamie ein erheblicher Vorsprung in bezug auf die Entwicklung der jungen Sporophyten gegenüber *D. Filix-mas* vorhanden ist. Ich glaube annehmen zu können, daß auch in der Natur das gleiche gilt, zumal wenn längere Trockenheit eine Befruchtung durch Spermatozoiden unmöglich macht. Eine solche Überlegenheit eines jeden Bastardprothalliums dürfte insbesondere gegenüber einem einzeln stehenden[1], erwachsenen Prothallium von *D. Filix-mas* bestehen, falls dieses, wie häufig zu beobachten ist, trotz seiner Anlage für Zwittrigkeit nur Archegonien trägt oder seine Antheridien schon vor dem Vorhandensein von Archegonien entleert hat. Ein Prothallium des Bastards ist — das gleiche gilt natürlich ebenso für *D. paleacea* und andere Fälle von Apogamie — mit größerer Wahrscheinlichkeit, unabhängig von einer Benetzung mit Wasser, in der Lage, eine Farnpflanze zu erzeugen.

Natürliche Bastarde Dryopteris Filix-mas × *paleacea* (= *D. Tavelii* Rothm.).

Nach den Befunden verschiedener Autoren kann es wohl keinem Zweifel unterliegen, daß Bastarde wie die eben beschriebenen auch in der Natur vorhanden sind. So beschreibt Rothmaler (1943) seine *Dryopteris Tavelii* Rothm. nov. hybr. als Bastard zwischen *D. Filix-mas* und *D. paleacea*. Für damit identisch hält er auch die *D. paleacea* f. *subintegra* Fomin. Rothmaler kennzeichnet diesen Bastard folgendermaßen: Im Habitus wie *D. paleacea*, häufig kräftiger entwickelt, mit weicheren Blättern; Fiederchen am Rand schwach gezähnt, an der Spitze abgerundet bis spitz; Schleier am Rande nicht nach unten umgerollt, sondern flach, weich und hinfällig. Bezüglich des Indusiums

[1] Dies bedeutet, daß keine Befruchtung durch ein Spermatozoid eines benachbarten Prothalliums erfolgen kann.

würde also ein Unterschied zwischen meinen Bastarden und der von ROTHMALER beschriebenen *D. Tavelii* bestehen, während hinsichtlich der übrigen Merkmale offenbar Übereinstimmung vorhanden ist. Es ist nun denkbar, daß in der Natur durch Rückkreuzung des Bastardes der beiden *Dryopteris*-Arten mit *D. Filix-mas* eine Pflanze entstehen kann, die mit *D. Filix-mas* — etwa hinsichtlich des Indusiums — mehr übereinstimmt als meine Bastarde. Dies ist ein Punkt, der weiterer Prüfung bedarf. Zu diesem Zwecke habe ich Rückkreuzungsversuche zwischen dem Bastard und *D. Filix-mas* angesetzt[1]. Auch hoffe ich, in einer späteren Arbeit ausführlich auf die *D. Tavelii*-Gruppe eingehen zu können.

Neuerdings hat REICHLING (1953) eine verbesserte und ausführlichere Beschreibung von *D. Tavelii*, die er in Luxemburg festgestellt hat, gegeben. Er klärt auch die oben erwähnte Unstimmigkeit, die bezüglich des Indusiums herrscht: In der Jugend ist das Indusium bei *D. Tavelii* am Rande umgebogen, bei der Reife wird es zurückgedrängt und erscheint dann flacher.

v. TAVEL (1937) vermutete schon bei einer Form, die er als *D. Borreri* var. *robusta* bezeichnet, Entstehung durch Kreuzung von *D. paleacea* (= *D. Borreri* NEWMAN) und *D. Filix-mas*. Auch nach Ansicht von Herrn E. OBERHOLZER und Herrn Dr. h. c. A. SCHUMACHER (briefliche Mitteilungen) treten Bastarde zwischen beiden Arten in der Natur auf, so in der Schweiz und im Rheinischen Schiefergebirge.

Von 3 verschiedenen Stellen lagen mir Blätter von *D. Filix-mas* × *paleacea* = *D. Tavelii* ROTHMALER vor[2]; durch Sporenaussaaten habe ich dieses Material in Kultur genommen. Stets zeigt sich übereinstimmend die große Ähnlichkeit mit *D. paleacea*, unter anderem die nur schwache Zähnelung der Fiederchen, die jedoch in den unteren Blattteilen wesentlich stärker ausgeprägt ist.

In England hat IRENE MANTON (1939, 1950), wie schon erwähnt, die Gattung *Dryopteris* cytologisch eingehend untersucht. Sie fand dort 2 in ihrer Chromosomenzahl verschiedene Formen von *D. paleacea*; die eine hat 82, die andere 123 Chromosomen. Diese Befunde stimmen überein mit meinen Zählungen (1939, vgl. oben). Damals gab ich an im einen Fall (*D. paleacea* var. *crist.*) etwa 80, im anderen etwa 130 Chromosomen. Da es mir andererseits bei *D. austriaca* (JACQU.) WOYNAR ssp. *dilatata* mit Sicherheit gelang, in der Haplophase die

[1] Ein früherer Rückkreuzungsversuch (DÖPP 1935) zwischen dem Bastard *D. austriaca* ssp. *dilatata* × *D. paleacea* und *D. austriaca* ssp. *dilatata* führte nicht zu einem vollen Erfolg, da die erhaltenen Pflanzen auf die Dauer nicht lebensfähig waren.

[2] Dieses Material verdanke ich den Herren E. OBERHOLZER in Samstagern (Schweiz), Dr. h. c. A. SCHUMACHER, Waldbröl (Rheinland) und Prof. L. REICHLING, Musée D'Histoire Naturelle, Luxemburg.

genaue Chromosomenzahl 82 nachzuweisen (1932), besteht für mich kein Zweifel, daß die von Manton angegebene Zahl 82 für *D. paleacea* durchaus einwandfrei ist. Außer diploider (82) und triploider (123) hat I. Manton auch tetraploide und pentaploide *D. paleacea* in England festgestellt, so daß sich folgende polyploide Reihe ergibt:

41	82	123	164	205
haploid	diploid	triploid	tetraploid	pentaploid

Bei den beiden letzten Formen (164 und 205 Chr.) handelt es sich nach Manton um Kreuzungen der diploiden, d. h. 82chromosomigen, und der triploiden, also 123chromosomigen *D. paleacea* mit *D. Filix-mas*, die im Gametophyten 82 Chromosomen besitzt:

$$82 + 82 = 164$$
$$82 + 123 = 205$$

Es liegt also offenbar auch hier *D. Tavelii* vor, zumal da die Pflanzen morphologische Merkmale beider Elternarten zeigen. An diesen Formen stellte Manton folgendes fest:

1. Die Sporenproduktion ist vor allem bei der pentaploiden Form gering; diese erzeugt besonders große Sporen.
2. Die Sporen liefern auch hier apogame Prothallien.
3. Die Sporangien mit 16 Sporenmutterzellen überwiegen bei weitem gegenüber den Sporangien mit 8 Sporenmutterzellen.
4. In den Sporenmutterzellen vom 16er Typ treten zahlreiche Bivalente auf, am häufigsten bei dem pentaploiden Bastard.

Somit ergibt sich eine schöne Übereinstimmung zwischen morphologischen und cytologischen Befunden an natürlichem (Manton) und meinem experimentell gewonnenen Material.

Schlußbetrachtungen.

Im Gegensatz zu dem Bastard *Asplenium germanicum* sind die hier besprochenen Bastarde *fertil*. Trotz partieller Sterilität der Sporangien werden reichlich keimfähige Sporen erzeugt. Die Pflanzen erscheinen nach Wuchs und Entwicklungsgeschwindigkeit durchaus lebenskräftig. Hiernach sowie auf Grund der Beobachtungen an Kulturversuchen über die gegenüber *D. Filix-mas* begünstigte Sporophytbildung (Tabelle 3) besteht kaum ein Zweifel, daß der Bastard *D. Tavelii* sich unter natürlichen Bedingungen behaupten kann. Die Angaben von Rothmaler und Reichling bestätigen dieses. Hinzu kommt, daß natürliche Bastarde nach den mir vorliegenden Materialproben Sporen in reichlicher Menge erzeugen, also eine größere Fertilität besitzen als meine experimentell gewonnenen bisher zeigten. Die Fertilität der Bastarde ist in Verbindung mit der *Konstanz* ihrer *Nachkommenschaft* wahrscheinlich eine Ursache dafür, daß *D. Tavelii* an ein und demselben Standort in größerer Individienzahl auftreten kann. Einmal

entstanden, kann der Bastard durch Sporen seinesgleichen erzeugen. *D. Tavelii* darf demnach mit vollem Recht als *Art* angesprochen werden. Es sei an Fälle bei den Angiospermen erinnert, in denen konstante Bastarde bzw. neue Arten durch Bastardierung und nachfolgende Genomverdoppelung entstanden sind. Im Entwicklungsablauf von *D. Filix-mas* × *D. paleacea* erstreckt sich allerdings die Chromosomenverdoppelung nur auf *ein* Entwicklungsstadium, auf *eine* Zelle, nämlich die Sporenmutterzelle, nicht auf die ganze Pflanze wie bei den Angiospermenbastarden. Die Rolle, die bei letzteren die Befruchtung hat, übernimmt bei jener der sich in jeder Sporophytgeneration immer wiederholende Mechanismus der Restitutionskernbildung. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß ich 1949 in einer vergleichenden Betrachtung verschiedener Befruchtungsvorgänge die Restitutionskernbildung formal als extrem reduzierten Sexualvorgang aufgefaßt und dementsprechend als „mitotische Autogamie" bezeichnet habe. Dem „Restitutionskerntyp" oder „mitotisch-autogamen Typ" bei *Dryopteris* stellte ich den „oogamen Typ" gegenüber.

D. paleacea zeichnet sich gegenüber *D. Filix-mas* bezüglich der Fortpflanzungsverhältnisse durch 3 Eigentümlichkeiten aus: 1. Fehlen der Archegonien, 2. Fähigkeit der Prothallien, durch vegetative Sprossung einen Sporophyten zu erzeugen (Apogamie), 3. Restitutionskernbildung.

Die beiden ersten Eigenschaften treten bei dem Bastard in unveränderter Form auf. Sie sind also, da die Genome der Elternpflanzen im 1. Versuch zahlenmäßig gleich sind, *dominant* gegenüber den entsprechenden Merkmalen von *Dryopteris Filix-mas*: 1. Ausbildung von Archegonien, 2. Fehlen der Fähigkeit zu apogamer Sprossung.

Auffällig ist diese Dominanz auch deswegen, weil sonstige Abweichungen bei den Farnen rezessiven Charakter haben (z. B. die *cristata*-Formen; Aposporie). Betrachtet man die Restitutionskernbildung rein äußerlich hinsichtlich ihrer Auswirkungen, nämlich der Bildung keimfähiger Sporen, die nur durch sie ermöglicht wird, so könnte man sie ebenfalls als dominant ansehen, wie ich es 1950 getan habe.

Sehr bemerkenswert ist, daß der Typ der Sporangien mit 8 oder 16 Sporenmutterzellen im Bastard stets unverändert beibehalten wird, d. h. niemals wurde ein Sporangium beobachtet, das etwa in einigen der 8 sporogenen Zellen Restitutionskernbildung, in den übrigen dagegen eine normale Kernteilung gezeigt hätte. Zwischentypen treten also nicht auf; nur das Zahlenverhältnis dieser Sporangien ändert sich.

Da die Bastarde nicht aufspalten, ist es bisher nicht möglich gewesen zu entscheiden, ob die Anlagen für die oben genannten aufeinander abgestimmten Eigenschaften durch ein und dasselbe oder durch

mehrere Gene bedingt werden, und ob diese im letzteren Falle in einem oder in mehreren Chromosomen eines 41chromosomigen Satzes lokalisiert sind.

Zusammenfassung.

1. Es gelang, die beiden Arten *Dryopteris Filix-mas* und *D. paleacea* miteinander zu kreuzen und einen konstanten Bastard zu erhalten.

2. Die Bastardpflanzen ähneln weit mehr *Dryopteris paleacea* als *D. Filix-mas* und zeigen weitgehende Übereinstimmung mit dem natürlichen Bastard *Dryopteris Tavelii* Rothmaler, den Rothmaler und Reichling beschrieben haben.

3. Die Chromosomenzahl der Bastardpflanzen beträgt, in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Manton an Material vom natürlichen Standort, 164 bzw. 205, je nachdem, ob als Elternpflanze *D. paleacea* mit 82 oder 123 Chromosomen benutzt wurde.

4. Die Besonderheiten im Entwicklungsablauf des Bastards stammen nur von *einer* der beiden elterlichen Arten, nämlich von *D. paleacea*: Apogamie, Fehlen der Archegonien, Restitutionskernbildung im 8zelligen sporogenen Gewebe. Die Prothallien des Bastards erzeugen ebenso wie die von *D. paleacea* nur Antheridien.

5. Auch in den Sporangien liegen im wesentlichen dieselben Verhältnisse wie bei *D. paleacea* vor. Keimfähige Sporen werden nur von solchen Sporenmutterzellen gebildet, die im Anschluß an eine Restitutionskernbildung im 8zelligen sporogenen Gewebe entstanden sind. In diesen im günstigsten Falle in 8-Zahl im Sporangium vorhandenen Sporenmutterzellen findet eine normale Meiosis statt. Die Sporangien mit 16 Sporenmutterzellen, die auf Grund einer normalen Zell- und Kernteilung aus dem 8zelligen Archespor hervorgehen, liefern dagegen nur sterile Sporen.

6. Gegenüber *D. paleacea* ist bei den Bastarden der Prozentsatz von Sporangien mit 8 großen Sporenmutterzellen erniedrigt, von Sporangien mit 16 kleinen Sporenmutterzellen erhöht. Demzufolge ist die Prozentzahl fertiler Sporen geringer als bei *D. paleacea*.

7. In Übereinstimmung mit den cytologischen Befunden konnte Konstanz in der Nachkommenschaft festgestellt werden.

8. Aus Kulturversuchen wird geschlossen, daß die Apogamie der Bastarde hinsichtlich der Bildung junger Sporophyten eine Entwicklungsbeschleunigung gegenüber der oogamen Fortpflanzung bei *D. Filix-mas*, selbst unter günstigsten Befruchtungsbedingungen, bedeutet.

9. Die experimentell erhaltenen Bastarde stimmen nicht nur in ihrer Entwicklungsweise, sondern bis in cytologische Einzelheiten mit den von Manton untersuchten englischen Naturhybriden überein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ihre Unterstützung bei der Beendigung der vorliegenden Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich auch dem Universitätsbund Marburg, durch dessen Hilfe es mir möglich war, die Kulturen während der schwierigen Kriegsverhältnisse am Leben zu erhalten und weiterzuführen.

Für mehrere Leihgaben (Hilfsmittel für die mikroskopischen Arbeiten) spreche ich der Firma Ernst Leitz in Wetzlar meinen Dank aus.

Literatur.

Döpp, W.: Die Apogamie bei *Aspidium remotum* Al. Br. Planta (Berl.) **17**, 86—152 (1932). — Versuche zur Herstellung von Artbastarden bei Farnen. I. Ber. dtsch. bot. Ges. **53**, 630—636 (1935). — Cytologische und genetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Dryopteris*. Planta (Berl.) **29**, 481—533 (1939). — Über *Dryopteris paleacea* Christensen (D. Borreri Newm.). Ber. dtsch. bot. Ges. **59**, 423—426 (1941). — Zur Problematik von *Dryopteris paleacea* (Sw.) C. Chr. und ihres Formen- und Verwandtschaftskreises. Ber. dtsch. bot. Ges. **62**, 61—68 (1949). — Cytologische und genetische Untersuchungen an *Dryopteris paleacea* C. Christensen (D. Borreri Newm.). VIII^{e} Congrès Internat. de Botanique, Paris 1954, Rapports et Communications parvenus avant le Congrès, Sect. 4, 22. — Knaben, Gunvor: Kromosomtall og generasjonsveksel hos *Dryopteris paleacea* (Sw.) C. Chr. i Norge. Blyttia **6**, 17—32 (1948). — Manton, Irene: Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta. Cambridge 1950. — Meyer, D. E.: Untersuchungen über Bastardierung in der Gattung *Asplenium*. Bibl. bot. **123**, 1—34 (1952). — Nordhagen, R.: *Dryopteris paleacea* (Sw.) C. Chr. og dens utbredelse i Norge. Blyttia **5**, 89—118 (1947). — Reichling, L.: *Dryopteris paleacea* (Sw.) Handel-Mazzetti et *Dryopteris Tavelii* Rothmaler au grand-duché de Luxembourg et en Belgique. Bull. Soc. roy. bot. Belg. **86**, 39—57 (1953). — Renner, O.: Artbastarde bei Pflanzen. In Handbuch der Vererbungswissenschaft, Bd. II. Berlin 1929. — Reznik, H.: Beobachtungen über die Winterruhe und Laubdauer der Farne des Odenwaldes. Verh. naturhist.-med. Verein Heidelberg **19**, 1—7 (1953). — Rosenberg, O.: Die semiheterotypische Teilung und ihre Bedeutung für die Entstehung verdoppelter Chromosomenzahlen. Hereditas (Lund.) 8, 305—338 (1927). — Rothmaler, W.: Der Formenkreis von *Dryopteris paleacea* (Sw.) Hand.-Mazz. Candollea **10**, 91—101 (1945). — Tavel, F. v.: *Dryopteris* Borreri und ihr Formenkreis. Verh. schweiz. naturforsch. Ges. **118**, 153—154 (1937). — Tischler, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte. Kernteilung und Kernverschmelzung. 2. Aufl. Berlin 1951.

Prof. Dr. W. Döpp, Marburg/Lahn, Hans-Sachs-Str. 9.

Planta, Bd. 46, S. 92—112 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen.

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ÜBER ETIOLEMENT UND PIGMENTGEHALT AN CHLOROPHYLLDEFEKTEN UND NORMALEN SPROSSEN VON *TRADESCANTIA ALBIFLORA* VAR. *ALBOVITTATA*.

Von

KLAUS DRUMM.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. Mai 1955.)

I. Einleitung.

Eine exakte Analyse der Etiolementserscheinungen hat sich erst angebahnt, als man begann, die verschiedenen Bereiche des sichtbaren Lichts auf ihre Wirksamkeit bei der Verhinderung des Etiolements zu prüfen.

Die ersten genaueren Einblicke brachten die Arbeiten von POPP (1926), FUNKE (1931), WITHROW (1941) und WENT (1941).

In der Folgezeit sind zahlreiche Arbeiten erschienen, deren Ergebnisse zeigen, daß die normale Blattdifferenzierung vom langwelligen Bereich des Spektrums (zwischen 600 und 700 mμ) am stärksten gefördert wird (PARKER und Mitarbeiter 1949), während sich bei der Verhinderung der Internodienstreckung sowohl der kurzwellige Anteil des Spektrums (zwischen 400 und 500 mμ), als auch der langwellige (zwischen 600 und 700 mμ) als wirksam erwies (BÜNNING 1941, WITHROW 1941, STOLWIJK 1952).

Das Bekanntwerden der Tatsache, daß die Aktionsspektren für die formative Wirkung große Ähnlichkeit mit den Aktionsspektren besitzen, die man bei der Untersuchung der Lichtwirkung auf die Samenkeimung (FLINT und MCALISTER 1937) und den Photoperiodismus (PARKER und Mitarbeiter 1949, WASSINK und Mitarbeiter 1951) gefunden hatte, stellte die Untersuchungen zum Etiolement in einen Fragenkreis allgemeinerer Bedeutung.

Zwangsläufig erhob sich nun auch die Frage nach den Substanzen, in denen die Absorption der wirksamen Lichtqualitäten erfolgt. Die Maxima der Aktionsspektren zwischen 600 und 700 mμ machen es wahrscheinlich, daß das dort absorbierende Pigment der Gruppe der Tetrapyrrole angehört und mit dem Chlorophyll in Zusammenhang steht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, an chlorophylldefekten Sprossen von *Tradescantia albiflora* var. *albovittata* zu untersuchen, ob diese zu normalen Etiolementserscheinungen fähig sind. Nachdem diese Versuche erfolgreich waren, sollte geprüft werden, ob auch hierbei sowohl Blauviolett als Rotorange wirksam sind und welche Pigmente in chlorophylldefekten Tradescantien vorkommen, die bei der hier entscheidenden Strahlungsabsorption wichtig sein könnten.

II. Material und Methode.

1. Anzucht der Versuchspflanzen.

In Vorversuchen hatte sich herausgestellt, daß das Material großer Variabilität unterworfen ist. Einer der Gründe hierzu ist sicher darin zu suchen, daß es sich um genetisch uneinheitliche Pflanzen handelte. Deshalb wurden Klonkulturen im Zeitraum von 4 Monaten herangezogen. Hierzu wurden von einer Mutterpflanze, die sowohl rein grüne, als auch panaschierte Seitensprosse hatte, Stecklinge laufend weitervermehrt, bis eine genügende Anzahl von Versuchspflanzen zur Verfügung stand. Zur Stecklingsgewinnung wurden Seitensprosse mit zwei gut entwickelten Blättern geschnitten. Diese kamen mit dem untersten Internodium zur Bewurzelung etwa 1,5 cm tief in sandige Erde. Bei 20 ± 2° C waren die Stecklinge nach 14 Tagen bewurzelt und in den Blattachseln begannen die Seitensprosse auszutreiben. Eine Anzahl der erscheinenden Seitensprosse war aus vollkommen chlorophylldefektem Gewebe aufgebaut. Der Vegetationspunkt von *Tradescantia* ist ja sektorialchimärisch gebaut. Wenn daher in einem chlorophylldefekten Sektor eine Sproßanlage entsteht, ist der daraus hervorgehende Sproß auch aus dem gleichen Gewebe aufgebaut (Thielke 1948). Stecklinge mit ganz geringem Anteil normalgrünen Gewebes bewurzeln sich sehr schlecht (Ruge 1952). Daher wurden bei der Auswahl der Stecklinge nur solche verwendet, bei denen das Verhältnis von normalem zu chlorophylldefektem Gewebe etwa 1:1 war. Diese wuchsen gut und bei etwa 18% (Durchschnitt aus allen Kulturen!) erschienen 1 manchmal auch 2 total chlorophylldefekte Sprosse. Dieser hohe Prozentsatz wurde dadurch erreicht, daß nur solche Stecklinge verwendet wurden, deren albicater Gewebeanteil möglichst zusammenhängend war. Die bewurzelten Stecklinge wurden in Töpfe mit kräftiger Gartenerde verpflanzt, je 3 chlorophylldefekte mit 2 normal grünen Vergleichspflanzen in einen Topf (in späteren Versuchen je 6 + 4). Nach 5 Tagen wurden die Terminalknospen entfernt, um durch Fortfall der korrelativen Hemmung die Seitensprosse zu stärkerem Wachstum zu veranlassen. Die panaschierten Pflanzen behielten so noch 5—6 chlorophyllhaltige Blätter. 10—14 Tage nach dem Verpflanzen hatten die Seitensprosse ein voll entwickeltes Blatt. Diese Pflanzen konnten nun zu den Versuchen verwendet werden, bei denen sie verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt wurden.

2. Lichtbedingungen.

Da keine genügend starke künstliche Lichtquelle zur Verfügung stand, wurden die Versuche bei normalem Tageslicht im Versuchsgewächshaus (20 ± 2° C) ausgeführt.

Eine Serie von Versuchspflanzen wurde im normalen Tageslicht gehalten, eine weitere Serie bei einem um etwa 50% reduzierten Tageslicht unter Mattglas. Zu den Versuchen über die morphogenetische Wirkung von Blauviolett und Rotorange wurden Schottfilter verwendet, unter denen die Lichtintensität etwa 20% des Tageslichts betrug. Unter den beiden Filtern wurden vergleichbare Intensitäten dadurch hergestellt, daß die Oberfläche mit Kalkmilch besprüht wurde, die nach dem Trocknen eine gut haftende Schicht gibt. Benützt wurden die Filter BG 12 (Blauviolett, optischer Schwerpunkt 410 mμ) und OG 2 (Rotorange, im wesentlichen durchlässig für Wellenlängen über 640 mμ). Die

Lichtintensitäten wurden mit einer Photozelle von bekannter spektraler Empfindlichkeit und einem Luxmeter gemessen.

Die Pflanzen standen in 30 cm hohen Blechzylindern von 16 cm Durchmesser. Um störendes Tageslicht auszuschalten, wurden die Filter in Deckeln aus schwarzem Karton, die 5 cm über den Rand der Blechzylinder übergriffen, befestigt. Zur besseren Luftzirkulation saßen die Filter auf Korkreitern. Damit wurde einem Beschlagen der Filter vorgebeugt. Außerdem ist ja bekannt, daß eine Erhöhung der Wasserdampfspannung ebenfalls formativ wirken kann. Während der Versuchsdauer wurden die Töpfe alle 4 Tage mit 10 cm^3 Wasser gegossen. Bei Versuchsbeginn wurde jeweils das letzte vollentwickelte Blatt der Seitensprosse mit Rußparaffin markiert. Nur die darauf folgenden Blätter und Internodien wurden später bei der Auswertung verwendet.

3. Auswertung.

Mit der Auswertung der Versuchspflanzen wurde begonnen, wenn die Seitensprosse unter den jeweiligen Lichtbedingungen ihren maximalen Entwicklungszustand erreicht hatten.

Das ist insofern sinnvoll, als sich die Pflanze je nach der gebotenen Lichtbedingung einem ganz bestimmten Habitus nähert. Dieser Endzustand wurde als erreicht angesehen, wenn die Internodien keine Längenzunahme und die Blätter kein Wachstum mehr zeigten. Deshalb war alle 4 Tage eine Kontrolle der Internodienlänge und der Blattbreite und Blattlänge nötig. Das wurde in der Weise erreicht, daß für jede Versuchsserie auf einer Karte mittels Stechzirkel die Längenzunahme der Internodien, ferner Längen- und Breitenzunahme der Blätter aufgetragen wurde. Im einzelnen wurden dann folgende Merkmale untersucht:

1. Internodienlänge. Sie wurde mittels Stechzirkel gemessen und die durchschnittliche Internodienlänge berechnet.

2. Blattdifferenzierung. Als Maß hierfür wurde die Spaltöffnungszahl je Flächeneinheit gewählt. Bei jedem Blatt wurden an 10 verschiedenen Stellen die Stomata je Mikroskopblickfeld gezählt. Die Angaben beziehen sich daher auf 2,78 mm^2. Auch hier wurde dann wieder die durchschnittliche Spaltöffnungszahl berechnet. In den Werten für die Spaltöffnungszahlen sind alle unvollständig differenzierten und daher nicht funktionsfähigen Stomata enthalten. Sie wurden aber gesondert gezählt.

3. Blattdicke. Zu ihrer Bestimmung wurden Handschnitte hergestellt und mit Hilfe des Okularmikrometers je 20 Schnitte pro Blatt gemessen. Die verwendeten Schnitte stammten aus dem Bereich der Lamina, der etwa 2 mm vom Blattrand und ebensoweit von der Blattmittelrippe entfernt war. Damit wurde am besten die Dicke der Blätter erfaßt, ohne daß eine zu große Streuung der Werte auftrat. Aus den Einzelmessungen wurde dann die mittlere Blattdicke berechnet.

Je nach Jahreszeit wurden die Versuche nach 5—7 Wochen beendet. Nach dieser Zeit standen genügend Internodien und Blätter zur Auswertung zur Verfügung. Außerdem konnten die Versuche nicht länger fortgeführt werden, da die Pflanzen dann oben an den Filtern anstießen und dadurch eine formative Wirkung durch mechanische Reizung zu erwarten war.

Das Pflanzenmaterial für die Pigmentbestimmungen wurde ebenfalls in der beschriebenen Weise herangezogen. Die Trennung und Identifizierung der Blattpigmente soll weiter unten bei der Besprechung der Ergebnisse der Pigmentbestimmung beschrieben werden.

III. Ergebnisse.

Vorversuche hatten ergeben, daß chlorophylldefekte und normale Pflanzen bei Verringerung der Lichtintensität Etiolementserscheinungen zeigen. Die stärkste Reaktion tritt bei den Internodien auf. Als weniger stark beeinflußbar hatte sich das Blattwachstum erwiesen. In den Versuchen wurden nun unter jeweils gleichen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen chlorophylldefekte und normale Pflanzen in vollem und reduziertem Tageslicht kultiviert und Internodienverlängerung und Blattdifferenzierung bestimmt. Da sich sowohl Licht aus dem blauvioletten als auch aus dem rotorangen Teil des Spektrums bei der Verhinderung bestimmter Etiolementserscheinungen wirksam erwiesen hatte (vgl. Einleitung!), durfte vermutet werden, daß auch bei dem untersuchten Objekt eine Beeinflussung möglich sei. Daher wurden gleichzeitig Pflanzen unter Blaufilter und Organgefilter kultiviert und mit Pflanzen von etioliertem und normalem Habitus verglichen.

Die Bedingungen von Luftfeuchtigkeit und Temperatur können in einem Versuchsgewächshaus naturgemäß nur für jeweils parallel laufende Versuche vollkommen konstant gehalten werden. Deshalb wurde darauf verzichtet, die Werte aus den Versuchen, die zu verschiedenen Jahreszeiten gemacht wurden, zu Mittelwerten zusammenzufassen.

1. Versuche zur formativen Lichtwirkung.

a) Beeinflussung der Internodien. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Internodien von chlorophylldefekten und normalen Pflanzen eine starke Überverlängerung erfuhren, wenn die Intensität des Lichts auf 50% verringert wurde. Blaulicht und Orangelicht erwiesen sich als sehr wirksam bei der Verhinderung der Internodienstreckung. Obwohl unter den beiden Filtern annähernd Intensitätsgleichheit herrschte, war die Wirkung des kurzwelligen Lichts größer. Die Werte lagen hier in der Größenordnung der Wirksamkeit des normalen Tageslichts. Bei den im Orangelicht aufgewachsenen Pflanzen zeigte sich eine geringere Wirkung bei der Verhinderung der Internodienstreckung im Vergleich zu den im Blaulicht aufgewachsenen Pflanzen. Die durchschnittliche Internodienlänge lag in der Größenordnung der Pflanzen, die bei 50% des normalen Tageslichtes gewachsen waren. Unter dem Orangefilter herrschte nur 20% der Tageslichtintensität. Also resultiert hier doch noch eine Hemmwirkung, wenn auch nicht so stark wie im annähernd intensitätsgleichen Blaulicht. Aus der Tabelle 1 ist weiterhin zu sehen, daß die Werte zu den verschiedenen Jahreszeiten erheblichen Schwankungen unterworfen waren. Dies ist auf die unterschiedliche Wachstumsaktivität zu den verschiedenen Jahreszeiten zurückzuführen. Trotz dieser unterschiedlichen Wachstumsaktivität konnte aber die Wirkung der gebotenen Lichtbedingungen zu jeder Jahreszeit reproduziert werden. Das ist aus der gleichsinnigen Veränderung der Internodienlänge klar ersichtlich.

Tabelle 1. *Internodienlänge unter den verschiedenen Lichtbedingungen* (in mm). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Einzelmessungen.

Lichtbedingung	Versuch I 28. 4. bis 30. 5.		Versuch II 26. 6. bis 25. 7.		Versuch III 3. 12. bis 12. 1.	
	defekt	normal	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	18,9 ± 1,0 (28)	38,4 ± 2,1 (20)	16,1 ± 1,9 (10)	46,3 ± 0,9 (4)	9,8 ± 0,9 (8)	37,0 ± 1,2 (30)
Reduziertes Tageslicht	31,0 ± 2,6 (8)	55,2 ± 4,3 (10)	— —	58,8 ± 2,4 (8)	14,6 ± 0,7 (6)	39,2 ± 2,5 (6)
Blauviolett	19,0 ± 1,3 (5)	57,5 ± 3,5 (8)	17,8 ± 1,0 (4)	47,5 ± 2,3 (6)	11,0 ± 2,0 (8)	28,0 ± 1,4 (8)
Rotorange	29,7 ± 2,4 (6)	63,8 ± 3,6 (12)	24,8 ± 0,7 (10)	60,8 ± 1,7 (10)	13,2 ± 1,8 (8)	48,9 ± 0,7 (8)

Lichtbedingung	Versuch IV 20. 1. bis 4. 3.		Versuch V 5. 3. bis 20. 4.		Versuch VI 25. 4. bis 4. 6.	
	defekt	normal	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	10,4 ± 1,1 (30)	36,2 ± 2,3 (32)	16,5 ± 0,8 (25)	43,4 ± 1,4 (30)	16,9 ± 1,0 (25)	43,2 ± 0,9 (35)
Reduziertes Tageslicht	13,5 ± 0,8 (15)	45,2 ± 2,3 (18)	23,0 ± 1,8 (28)	55,7 ± 0,8 (32)	26,6 ± 0,6 (25)	63,6 ± 1,1 (30)
Blauviolett	11,7 ± 0,9 (17)	33,0 ± 1,2 (20)	16,2 ± 1,1 (18)	34,3 ± 1,8 (25)	19,1 ± 0,9 (20)	58,4 ± 2,3 (20)
Rotorange	15,4 ± 1,0 (25)	48,1 ± 0,9 (30)	15,9 ± 1,1 (35)	53,9 ± 2,1 (18)	26,6 ± 0,9 (16)	62,7 ± 1,9 (20)

b) Beeinflussung des Blattflächenwachstums. Da bei der relativ geringen Zahl der auswertbaren Blätter keine verläßlichen Durchschnittswerte für die absolute Blattgröße zu ermitteln waren, mußten andere Kriterien zur Charakterisierung der Blattdifferenzierung gefunden werden. Ein zuverlässiges Maß für den Grad der Blattentwicklung bietet die Bestimmung der Spaltöffnungszahl pro Flächeneinheit. Aus Tabelle 2 geht zunächst hervor, daß bei der Spaltöffnungszahl zwischen chlorophylldefekten und normalen Pflanzen nur ein geringer Unterschied besteht. Makroskopisch äußert sich das darin, daß sich die Blätter in ihrer Größe kaum unterscheiden. Eine Verringerung der Lichtintensität führt zu einem Ansteigen der Spaltöffnungszahl, wobei die Wirkung bei Albinopflanzen und Normalpflanzen etwa gleich war. Eine Hemmung der Blattdifferenzierung ist hier also eindeutig. Bei den mit Blaulicht und Orangelicht behandelten Normalpflanzen zeigte sich keine gesicherte Zunahme der Spaltöffnungszahl gegenüber den im Tageslicht gehaltenen Pflanzen. Das heißt also, daß die Blattdifferenzierung in den untersuchten Spektralbereichen eine Förderung erfährt. Auch bei den chloro-

Tabelle 2. *Spaltöffnungszahl unter den verschiedenen Lichtbedingungen.*
Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Einzelmessungen.

Lichtbedingung	Versuch I, 28. 4. bis 30. 5.		Versuch II, 26. 6. bis 25. 7.	
	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	62,8 ± 1,0 (40)	59,4 ± 0,7 (40)	53,9 ± 0,9 (40)	50,0 ± 0,6 (50)
Reduziertes Tageslicht	66,2 ± 0,6 (40)	60,1 ± 0,6 (40)	63,3 ± 0,5 (30)	66,0 ± 0,5 (40)
Blauviolett	62,6 ± 0,9 (30)	55,4 ± 1,1 (40)	66,0 ± 1,3 (30)	57,6 ± 0,9 (40)
Rotorange	79,0 ± 0,8 (40)	51,2 ± 1,1 (40)	76,9 ± 1,0 (30)	54,0 ± 0,9 (40)

Lichtbedingung	Versuch IV, 20. 1. bis 4. 3.		Versuch V, 5. 3. bis 20. 4.	
	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	52,9 ± 1,2 (40)	51,5 ± 0,9 (50)	56,8 ± 0,7 (50)	55,7 ± 0,6 (50)
Reduziertes Tageslicht	65,0 ± 0,7 (50)	64,2 ± 0,7 (50)	69,5 ± 1,1 (50)	68,9 ± 1,0 (50)
Blauviolett	62,1 ± 0,8 (50)	59,7 ± 1,1 (50)	64,7 ± 0,9 (50)	56,4 ± 0,8 (50)
Rotorange	74,2 ± 0,5 (50)	53,9 ± 0,8 (50)	76,4 ± 0,8 (50)	57,4 ± 0,9 (50)

phylldefekten Pflanzen ist im kurzwelligen Licht noch eine Förderung zu erkennen. Die Spaltöffnungszahlen liegen in der Größenordnung wie bei den unter Mattglas gewachsenen Pflanzen. Wenn man beachtet, daß die Intensität unter dem Blaufilter nur 20% der Tageslichtintensität betrug, im Gegensatz zu 50% unter dem Mattglas, wird die fördernde Tendenz auch hier erkennbar, obwohl sie wesentlich geringer ist als bei den Normalpflanzen. Die höchste Spaltöffnungszahl trat bei den chlorophylldefekten Pflanzen im Orangelicht auf. Hieraus läßt sich aber an Hand der vorliegenden Versuche noch nicht entscheiden, ob langwelliges Licht bei der Ausbildung der Blätter von Albinopflanzen morphogenetisch vollkommen unwirksam ist.

Tabelle 3. *Zahl der unvollständig ausdifferenzierten Spaltöffnungen pro 2,78 mm² unter den verschiedenen Lichtbedingungen.*

	Versuch II		Versuch IV		Versuch VI	
	defekt	normal	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	0	0	0	0	0	0
Mattglas	3,4	4,4	4,9	5,2	4,7	4,0
Blauviolett	3,0	3,9	3,5	3,8	4,0	3,1
Rotorange	3,2	2,1	3,1	3,7	3,7	3,3

Tabelle 4. *Blattdicke unter den verschiedenen Lichtbedingungen* (in μ). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Einzelmessungen.

Lichtbedingung	Versuch I, 28. 4. bis 30. 5.		Versuch II, 26. 6. bis 25. 7.	
	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	$348 \pm 2{,}4$ (80)	$400 \pm 5{,}1$ (80)	$335 \pm 3{,}7$ (80)	$389 \pm 3{,}1$ (100)
Reduziertes Tageslicht	$273 \pm 2{,}7$ (80)	$303 \pm 4{,}1$ (80)	$267 \pm 4{,}3$ (60)	$333 \pm 3{,}7$ (80)
Blauviolett	$238 \pm 3{,}5$ (60)	$308 \pm 4{,}5$ (80)	$257 \pm 3{,}3$ (60)	$307 \pm 2{,}5$ (100)
Rotorange	$268 \pm 3{,}2$ (80)	$270 \pm 3{,}9$ (80)	$247 \pm 2{,}4$ (60)	$280 \pm 3{,}6$ (60)

Lichtbedingung	Versuch IV, 20. 1. bis 4. 3.		Versuch V, 5. 3. bis 20. 4.	
	defekt	normal	defekt	normal
Tageslicht	$329 \pm 2{,}0$ (100)	$384 \pm 3{,}2$ (100)	$334 \pm 4{,}0$ (100)	$405 \pm 3{,}6$ (100)
Reduziertes Tageslicht	$244 \pm 2{,}3$ (100)	$289 \pm 3{,}5$ (100)	$255 \pm 4{,}1$ (80)	$310 \pm 3{,}4$ (100)
Blauviolett	$227 \pm 3{,}4$ (80)	$305 \pm 3{,}2$ (100)	$278 \pm 3{,}1$ (80)	$322 \pm 3{,}6$ (100)
Rotorange	$256 \pm 3{,}7$ (80)	$285 \pm 2{,}6$ (100)	$275 \pm 3{,}4$ (100)	$308 \pm 3{,}9$ (100)

Kurz soll hier noch erwähnt werden, daß auch die Zahl der unvollständig ausdifferenzierten Spaltöffnungen Aufschluß über die Wirksamkeit der einzelnen Lichtbedingungen geben kann. Die Tabelle 3 zeigt, daß ihre Zahl auch dort am höchsten lag, wo die stärkste Hemmung der Blattdifferenzierung zu verzeichnen war.

Auch hier waren die Ergebnisse praktisch zu jeder Jahreszeit reproduzierbar.

c) Beeinflussung des Blattdickenwachstums. Weiteren Aufschluß über die Reaktion der Blätter unter den gegebenen Lichtbedingungen gibt die Betrachtung der Blattdicke. Vorauszuschicken ist, daß hier wieder zwischen chlorophylldefekten und normalen Pflanzen ein größerer Unterschied in der Blattdicke besteht. Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, sind die Unterschiede gesichert. Bei Heranzucht unter reduziertem Tageslicht trat eine Abnahme der Blattdicke ein. Weiter geht aus der Tabelle 4 hervor, daß auch im Blaulicht und Orangelicht eine Abnahme der Blattdicke zu erkennen ist. Die Werte liegen jedoch alle in der Größenordnung der unter Mattglas kultivierten Pflanzen, es ist also trotz noch stärker reduzierter Lichtintensität keine weitere Abnahme der Blattdicke zu verzeichnen. Daraus darf geschlossen werden, daß in den untersuchten Spektralbereichen insgesamt eine Förderung des Blattdickenwachstums erfolgt. Beim Vergleich der im Blaulicht gewachsenen

Pflanzen mit den im Orangelicht gewachsenen treten wohl kleine Unterschiede auf. Diese besitzen jedoch nicht genügend Realität, um zu weitergehenden Schlüssen zu berechtigen. Beim Messen der Schnitte wurde auch die Zahl der Zellschichten des Mesophylls mitgezählt. Dabei wurde festgestellt, daß das Mesophyll stets ein 3—4schichtiges, undifferenziertes Schwammparenchym ist, wie es *Tradescantia* auch in normalem Tageslicht ausbildet. Bei der beobachteten Beeinflussung der Blattdicke handelt es sich daher um eine ausschließliche Wirkung auf die Zellgröße, und keinesfalls auf die Zellteilung.

Bei der Betrachtung der Versuchsergebnisse könnte der Einwand geltend gemacht werden, es handle sich nicht um eine formative Lichtwirkung, sondern ganz einfach um einen Effekt der bei den verschiedenen Lichtbedingungen verschiedenen Photosynthese. Aber die Parallelität der Ergebnisse an chlorophylldefekten und normalen Pflanzen vermag diesen Einwand leicht zu entkräften. Die ersteren hatten infolge des Zurückschneidens bei Versuchsbeginn in weiten Grenzen schwankende Anteile von voll assimilationsfähigem Gewebe, das ausschließlich zu ihrer Ernährung diente, während die Vergleichspflanzen über einen normal funktionsfähigen Assimilationsapparat verfügten. Pflanzen, bei denen alle grünen Blätter entfernt waren, starben nach kurzer Zeit ab. Wenn auch die Assimilation hier zweifellos als komplizierender Faktor hinzutritt, so zeigt doch die gleichsinnige Beeinflussung von normalen und albicaten Sprossen, daß die formative Wirkung überwiegt. Das intakte Gewebe ist also wenigstens für die begrenzte Dauer der Versuche in der Lage, das defekte Gewebe ausreichend mitzuernähren. Möglicherweise konnten die Pflanzen auch noch auf einen gewissen Vorrat von Reservestoffen zurückgreifen.

Die vergleichende Untersuchung hat gezeigt, daß bei chlorophylldefekten Sprossen von *Tradescantia* in gleicher Weise Etiolementserscheinungen auftraten wie bei normalen Sprossen. Durch Licht sowohl aus dem kurzwelligen als auch aus dem langwelligen Bereich des Spektrums konnten diese Erscheinungen beeinflußt werden. Es darf also angenommen werden, daß die Lichtabsorption bei Albino- und Normalsprossen in gemeinsamen oder mindestens sehr ähnlichen Substanzen erfolgt. Um Aufschlüsse über die bei der Lichtabsorption beteiligten Vorgänge zu gewinnen, soll im folgenden eine vergleichende Untersuchung der im sichtbaren Bereich absorbierenden Pigmente durchgeführt werden.

2. Untersuchung der Pigmente.

Da das Material aus den Klonkulturen nicht ausreichte, wurden auch noch andere Pflanzen zur Stecklingsvermehrung mit herangezogen. Obwohl bei *Tradescantia* auch die Internodien Plastiden führen, wurden

nur die Blätter zur Extraktion verwendet. Bei diesen ist der Anteil des plastidenführenden Gewebes größer und es darf angenommen werden, daß sich im Pigmentbestand der Blattplastiden kein Unterschied zu den Internodienplastiden ergibt.

Um Anhaltspunkte zur Auftrennung der Pigmente zu erhalten, wurde zunächst die Absorption eines Gesamtextraktes von chlorophylldefekten Pflanzen bestimmt.

Hierzu wurde 1 g frische Blätter unter Zusatz von $CaCO_3$ mittels Sand in der Reibschale zerrieben und der Brei auf der Nutsche mit Aceton (DAB 6 Merck) bis zur Farblosigkeit extrahiert. Zum Acetonextrakt wurde Äther zugegeben,

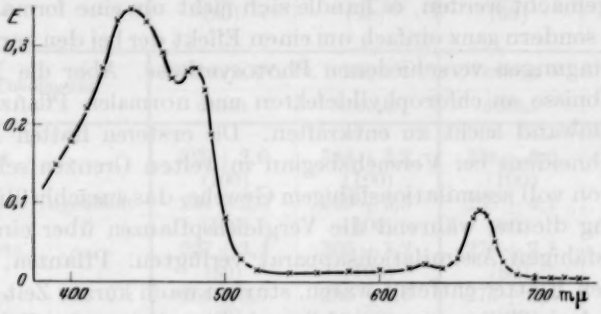


Abb. 1. Extinktionskurve eines Gesamtextrakts von chlorophylldefekten Blättern. (10 g Frischmaterial in 10 cm³ Äther. 1 cm-Cuvette.) Ordinate: Extinktion. Abszisse: Wellenlänge in mμ.

durch Wasserzusatz die Pigmente in den Äther übergeführt und mehrmals gewaschen. Der Ätherextrakt wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum auf 10 cm³ eingeengt und photometriert.

Die Absorptionskurve des Extrakts (Abb. 1) zeigt ein breites Maximum zwischen 400 und 500 mμ, ein zweites geringeres Maximum zwischen 660 und 670 mμ. Von hier nahm die Absorption kontinuierlich zum Infrarot hin ab. Das erste Maximum deutet auf die Anwesenheit mehrerer Carotinoide, deren Maxima sich überlagern. Das kleinere Maximum zeigt, daß geringe Mengen von Chlorophyllen oder verwandte Pigmente vorhanden sind. Es erweist sich also als notwendig, eine Trennung der Farbstoffe durchzuführen. Im weiteren Verlauf der Pigmentbestimmungen wurden nun jeweils 10 g frische Blätter von chlorophylldefekten, bzw. 1 g von normalen Pflanzen nach folgender Methode aufgearbeitet:

a) Herstellung der Gesamtextrakte. Da es sich bei dem Material um geringe Pigmentmengen handelte, wurde auf eine Trocknung verzichtet, um eine mögliche Zerstörung von Farbstoffen zu vermeiden. Beim Trocknen unter erhöhter Temperatur erfolgt ein teilweiser Carotinoidabbau durch Mitwirkung einer Lipoxydase (BERNSTEIN und THOMPSON 1947). Die Blätter wurden wieder unter $CaCO_3$-Zusatz mit Seesand zerrieben und auf der Nutsche mit Aceton erschöpfend extrahiert (etwa 80—100 cm³). Die bei der Extraktion verwendeten Lösungsmittel und Geräte

wurden in der Kühltruhe auf 0° C gekühlt. Der Acetonextrakt wurde dann im Schütteltrichter mit 10 cm³ Petroläther versetzt und durchgeschüttelt. Durch Wasserzusatz wurden die Pigmente in den Petroläther übergetrieben und abgetrennt. Ein Zusatz von 20%iger $(NH_4)_2SO_4$-Lösung brachte die kolloidalen Eiweiße zur Dekantation (Douin 1953). Das Aceton-Wasser-Gemisch wurde dann mehrere Male mit 5 cm³ Petroläther kräftig durchgeschüttelt, um die letzten Pigmentspuren quantitativ zu erfassen, und die petrolätherischen Extrakte dann vereinigt. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde der Extrakt im Vakuum auf etwa 5 cm³ eingeengt.

b) Bestimmung der Chlorophylle. Zur Abtrennung der Chlorophylle wurde der Gesamtextrakt an einer Puderzuckersäule (3 Teile Puderzucker 1 Teil Kristallzucker) adsorbiert (Seybold und Egle 1939). Durch Nachwaschen mit Benzin wurden die epiphasischen Carotinoide zum Durchlauf gebracht (Durchlauf I). Dann wurden die Saugflaschen gewechselt, 5 cm³ Benzol auf die Säule gegeben und damit die hypophasischen Carotinoide von der Chlorophyllzone gelöst. Mit Benzin, das wenig Methanol enthielt (100 cm³ Benzin, 20 Tropfen Methanol), wurden die Xanthophylle dann restlos aus der Säule gewaschen (Durchlauf II). Bis zur Weiterverarbeitung wurde Durchlauf I und II unter Stickstoff bei 0° C in der Kühltruhe aufbewahrt. Eine vollständige Trennung der Chlorophylle unterblieb, da sich Chlorophyll a und b nebeneinander bestimmen lassen (Comar und Zscheile 1942). Die Säule wurde nun unter Stickstoff trocken gesaugt, die Zone mit den Chlorophyllen herausgestochen, mit Methanol eluiert und im Schütteltrichter durch Wasserzusatz in Äther (peroxydfrei!) übergeführt. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat wurde die auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllte Lösung im Zeiss-Opton-Spektralphotometer (MQ 4) bei 6600 Å und 6425 Å (= Absorptionsmaxima von Chlorophyll a und b) photometriert. Aus den Extinktionswerten erhält man dann den absoluten Chlorophyllgehalt nach den beiden Formeln von Comar und Zscheile:

Tabelle 5. *Chlorophyllgehalt (Chlorophyll a und b, Gesamtchlorophyll)* in *γ/g Frischgewicht und mittlerer Fehler von chlorophylldefekten und normalen Blättern.*

Chlorophyll a in γ/g Frischgewicht	Chlorophyll b in γ/g Frischgewicht	a/b
chlorophylldefekt		
1,8 ± 0,1	1,17 ± 0,09	1,56
Gesamtchlorophyll: 2,97 γ/g Frischgewicht		
normal		
145,3 ± 3,2	68,8 ± 1,5	2,2
Gesamtchlorophyll: 214,1 γ/g Frischgewicht		

$$\text{Chlorophyll a (mg/l)} = 9{,}93 \cdot E_{6600} - 0{,}777 \cdot E_{6425}$$
$$\text{Chlorophyll b (mg/l)} = 17{,}6 \cdot E_{6425} - 2{,}81 \cdot E_{6600}$$

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse von jeweils 8 Bestimmungen festgehalten. Die relativ großen Fehler sind auf den großen Wassergehalt des Materials zurückzuführen. Bekanntlich ist bei *Tradescantia* die Epidermis als Wasserspeichergewebe ausgebildet, demgegenüber das Mesophyll zurücktritt. Eine geringe Turgorschwankung wird deshalb zu relativ großen Fehlern bei der Farbstoffbestimmung führen.

c) Trennung, Identifizierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide. Die in Benzin gelösten epiphasischen Carotine wurden nun an einer $Ca(OH)_2$-Säule adsorbiert (Karrer und Jucker 1948). Nach Einsaugen der Lösung wurde mit Benzin/Aceton (95:5) entwickelt (Moster und Quackenbusch 1952).

Durchlauf I von den chlorophylldefekten Pflanzen zeigte keine sichtbare Auftrennung mehr. Jedoch konnte photometrisch noch ein weiteres Pigment unterhalb der Zone I nachgewiesen werden, das sich als identisch mit dem Pigment der Zone II bei den Normalpflanzen erwies.

Bei den weiteren Bestimmungen wurde deshalb der Durchlauf I von den Albinopflanzen gleich im Vakuum bis zur Trockne eingedampft, mit Hexan (puriss., Riedel de Haën) aufgenommen und photometriert. Durchlauf I von den Normalpflanzen konnte weiter aufgetrennt werden in 2 Zonen. Nach dem Trockensaugen unter Stickstoff wurden diese mit Hexan/Aceton eluiert (MOSTER und QUACKENBUSCH), die Pigmente durch Wasserzusatz in das Hexan übergetrieben und das restliche Aceton durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Lösungen der Carotine wurden dann getrocknet, auf ein bestimmtes Volumen im Vakuum eingedampft und photometriert.

Zone I wurde als β-Carotin bestimmt (Maxima in Hexan 425 · 451 · 482 mμ; nach GOODWIN 1954). Zone II wurde als α-Carotin identifiziert (Maxima in Hexan 422 · 446 · 474 mμ nach MOSTER und QUACKENBUSCH).

Die hypophasischen Xanthophylle des Durchlaufs II wurden nun auf einer weiteren Zuckersäule getrennt. Hierzu mußte der Durchlauf zuerst im Vakuum unter Stickstoff bis zur Trockne eingedampft werden, da er in benzin-benzolischer Lösung vorlag. Der Rückstand wurde dann in Petroläther aufgenommen, auf die Zuckersäule gegeben und eingesaugt. Entwickelt wurde mit Benzin/Aceton (97:3). Dabei erfolgte eine Auftrennung in eine obere, rein gelbe Zone und eine untere, dunkelgelbe Zone. Die beiden Zonen wurden mit Äthanol abs. auf der Glasfilternutsche eluiert, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und photometriert. Das Pigment aus Zone I hatte folgende Maxima (in Äthanol 422 · 444 · 472 mμ; in Hexan 443 · 472 mμ). Auf Grund der Maxima besteht sowohl die Möglichkeit, daß es sich um Violaxanthin, als auch daß es sich um Taraxanthin handelt. Zur Entscheidung dieser Frage wurde eine Probe in Äther übergeführt und mit konz. HCl geschüttelt. Bei Violaxanthin müßte ein Farbumschlag nach Blau erfolgen (KARRER und JUCKER). Die Reaktion verlief negativ. Es handelt sich daher wohl um Taraxanthin (Maxima nach GOODWIN 1952, GOODWIN 1954). Zone II wurde als Lutein identifiziert (Maxima in Äthanol 420 · 446,5 · 476 mμ, nach KARRER und JUCKER; in Hexan 420 · 447 · 477 mμ nach GOODWIN 1954). Der Durchlauf von der Xanthophylltrennung zeigte eine schwachgelbe Färbung. Beim Photometrieren in Äthanol zeigten sich Absorptionsmaxima bei 448 mμ und 478 mμ, die auf die Anwesenheit eines weiteren Carotinoids schließen lassen. Infolge der geringen Menge konnte aber eine genauere Identifizierung nicht vorgenommen werden.

Zur exakten Bestimmung der Absorptionskurven wurden die getrennten Pigmente jeweils einer weiteren Reinigung auf einer Zucker-

bzw. $Ca(OH)_2$-Säule unterworfen. Die Hauptcarotinoide aus chlorophylldefekten Pflanzen sind in Abb. 2 dargestellt. Zur quantitativen Bestimmung der Pigmente wurde im weiteren Verlauf der Versuche nur noch die Extinktion der getrennten Farbstoffe in ihrem Absorptionsmaximum bestimmt. Der Pigmentgehalt je Gramm Frischgewicht wurde hieraus nach den bei GOODWIN angegebenen Kalkulationswerten berechnet (Kalkulationswert: $E\,\frac{1\%}{1\,cm}$ = Extinktion einer 1%igen Lösung bei 1 cm Schichtdicke, im Absorptionsmaximum gemessen. Aus GOODWIN 1954). In der Tabelle 6 sind die Carotinoidgehalte chlorophylldefekter und normaler Pflanzen zusammengestellt.

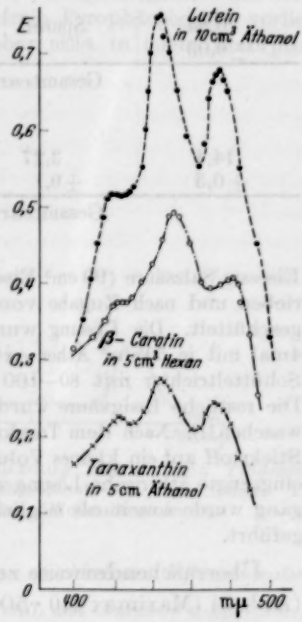


Abb. 2. Absorptionsspektren der Hauptcarotinoide aus chlorophylldefekten Pflanzen. (Aus 10 g frischen Blättern. 1 cm-Cuvette.) Ordinate: Extinktion. Abszisse: Wellenlänge in mμ.

d) Untersuchung auf Tetrapyrrole. In neueren Arbeiten, die sich mit der Wirkung langwelligen Lichts auf die verschiedensten Erscheinungen befassen (Photoperiodismus, Etiolement, Förderung der Samenkeimung, Literatur s. Zusammenfassung bei BÜNNING 1953), mehren sich die Angaben, die auf eine Beteiligung von Pigmenten aus der Gruppe der Tetrapyrrole hindeuten. Allem Anschein nach handelt es sich nicht um Chlorophyll, das ja ebenfalls zu dieser Stoffklasse gehört, vermutlich aber doch um Verbindungen, die in irgendeiner Weise, die bis jetzt noch nicht geklärt ist, im Zusammenhang mit der Biosynthese des Chlorophylls stehen. Wie GRANICK (1948, 1950) gezeigt hat, besteht prinzipiell die Möglichkeit, solche Intermediärprodukte zu fassen, wenn diese Synthesekette gestört ist. Es liegt daher nahe, bei dem vorliegenden Objekt in dieser Richtung zu suchen. Hierzu wurden chlorophylldefekte Blätter von *Tradescantia* nach einem Verfahren extrahiert, das GRANICK (1948) veröffentlicht hat. Die Methode mußte etwas modifiziert werden, denn der Autor hatte sie speziell zur Extraktion von Algenmutanten entwickelt.

Etwa 15—20 g frische Blätter wurden unter $CaCO_3$-Zusatz mit Seesand in der Reibschale zu einem Brei verrieben. Während des Zerreibens wurden 10 cm³ Äthanol zugesetzt. Das homogenisierte Material wurde dann auf der Nutsche zuerst mit Äthanol abs. (100 cm³), dann mit Äthanol/Äther (3:1) bis zur Farblosigkeit extrahiert. Das zuletzt eingesetzte Lösungsmittel wurde photometrisch auf Reinheit geprüft. Darauf wurde das Material von der Nutsche in 50 cm³

Tabelle 6. *Carotinoidgehalt von defekten und normalen Blättern.*

Durchschnittswerte aus mehreren Einzelbestimmungen (Defekt: 10 Einzelbestimmungen. Normal: 6 Einzelbestimmungen) und mittlerer Fehler.

β-Carotin in γ/g Frischgewicht	α-Carotin in γ/g Frischgewicht	Taraxanthin in γ/g Frischgewicht	Lutein in γ/g Frischgewicht	Unbekannt
		chlorophylldefekt		
0,84 ± 0,03	Spuren	0,63 ± 0,03	3,26 ± 0,09	+
Gesamtcarotinoide: 4,73 γ/g Frischgewicht				
		normal		
14,1 ± 0,3	3,27 ± 0,1	7,04 ± 0,09	21,75 ± 0,5	+
Gesamtcarotinoide: 46,16 γ/g Frischgewicht				

Eisessig/Salzsäure (99 cm³ Eisessig + 1 cm³ 6n HCl) übergeführt, längere Zeit verrieben und nach Zugabe von 100 cm³ Äther (peroxydfrei) etwa 10 min kräftig geschüttelt. Die Lösung wurde vom Rückstand abdekantiert und dieser noch 4mal mit je 50 cm³ Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden im Schütteltrichter mit 80—100 cm³ 2n Kaliumacetat gewaschen und abgetrennt. Die restliche Essigsäure wurde mit Wasser herausgewaschen (mindestens 10mal waschen!!). Nach dem Trocknen wurde die ätherische Lösung im Vakuum unter Stickstoff auf ein kleines Volumen (8—10 cm³) eingeengt und photometriert. Die eingeengte ätherische Lösung zeigte eine schwach olivgrüne Färbung. Der Arbeitsgang wurde soweit als möglich im Licht einer grünen Dunkelkammerlampe ausgeführt.

Überraschenderweise zeigte das aufgenommene Absorptionsspektrum (Abb. 3) (Maxima: 410 · 505 · 535 · 610 · 668 mμ) keine typischen Protoporphyrinbanden, wie eher erwartet wurde, sondern sehr große Ähnlichkeit mit Methylpyrophäophorbid a (Maxima: 410 · 506 · 534 · 560 · 610 · 667,5 mμ). Dieses Pigment ist schon länger bekannt (FISCHER und ORTH 1940). Aber erst vor kurzem konnte es in pflanzlichem Gewebe aufgefunden werden (TODD und GALSTON 1954). Allein auf Grund des aufgenommenen Absorptionsspektrums ist es unmöglich zu entscheiden, ob es sich nicht doch um ein Abbauprodukt des Chlorophylls handelt, das bei der Extraktion entstanden ist. Die Absorptionsspektren von Phäophytin und den Phäophorbiden haben ganz ähnliche Maxima. Zur Sicherheit wurden daher noch chemische Reaktionen durchgeführt. Zunächst die *Phasenprobe* (FISCHER und ORTH). Hierzu wurden die Lösungen von 6 Extraktionen vereinigt und zur ätherischen Lösung tropfenweise methanolische Kalilauge zugefügt. Die Reaktion verlief negativ. Bei Anwesenheit von Phäophytin oder Phäophorbiden müßte eine Gelbfärbung der alkalischen Schicht erfolgen, die dann nach Grün

umschlägt, während bei der Anwesenheit von Methylpyrophäophorbid a oder Pyrophäophorbid a keine Farbreaktion erfolgt. Weiter wurde noch die *Reaktion mit konzentrierter Salpetersäure* (WILLSTÄTTER 1913) gemacht: Die Pigmentlösung wurde mit konz. Salpetersäure unterschichtet. Bei Phäophytin müßte eine Blaufärbung der ätherischen Schicht auftreten. Auch diese Reaktion verlief negativ.

Da das Methylpyrophäophorbid a ein Ester ist, erfolgt möglicherweise bei der Extraktion eine Verseifung, so daß dann das freie Pyrophäophorbid vorliegen würde. Ester und Säure unterscheiden sich aber nicht in ihrem Absorptionsverhalten und ihren Reaktionen.

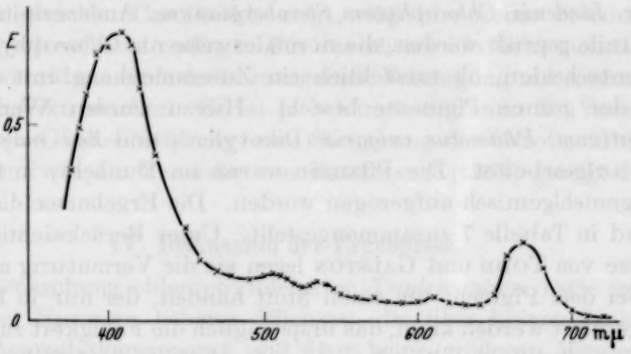


Abb. 3. Absorptionsspektrum des aus chlorophylldefekten Blättern von *Tradescantia* extrahierten Tetrapyrrolpigments. (Aus 20 g Frischmaterial. In 8 cm³ Äther. 1 cm-Cuvette.) Ordinate: Extinktion. Abszisse: Wellenlänge in mμ.

Tabelle 7. *Absorptionsmaxima von Extrakten aus verschiedenem Pflanzenmaterial.*

Zum Vergleich wurden die Maxima des von TODD und GALSTON aufgefundenen Pigments aufgeführt.

Extrahiertes Pflanzenmaterial	Absorptionsmaxima (mμ) in Äther					
Gereinigtes Pigment aus Blaugrassamen (Poa spec.) (nach TODD und GALSTON) .	410	506	534	560	610	667,5
Extrakt aus Blättern von *Tradescantia albiflora* (chlorophylldefekt)	410	505	535	—	610	668
Extrakt aus Blättern von *Tradescantia albiflora* (normal grün)	—	—	—	—	—	—
Extrakt aus *Dracaena fragrans* var. *Lindenii* (chlorophylldefekt)	—	—	—	—	—	—
Extrakt aus *Xanthosoma maximiliani* (chlorophylldefekt)	410	505	—	—	610	668
Extrakt aus *Pelargonium zonale* (chlorophylldefekt)	—	—	—	—	—	—
Extrakt aus *Chlorophytum Sternbergianum* (chlorophylldefekt)	—	—	—	—	—	—
Extrakt aus Wurzeln von *Pisum sativum*	—	—	—	—	—	—
Extrakt aus Wurzeln von *Phaseolus vulgaris*	—	—	—	—	—	—
Extrakt aus Wurzeln von *Zea mays* . . .	—	—	—	—	—	—

Nun tritt die weitere Frage auf, ob der gefundene Farbstoff auch in Normalpflanzen vorkommt. Die photometrische Prüfung von Extrakten aus solchen Pflanzen verlief jedoch negativ (Tabelle 7). Das berechtigt zu der Annahme, daß die fragliche Substanz normalerweise nur bei Störung der Chlorophyllsynthesekette in faßbarer Menge angereichert wird. Zur Prüfung dieser Annahme war es einerseits nötig, weitere chlorophylldefekte Pflanzen zu untersuchen, um festzustellen, ob sie die gleiche Substanz enthalten. Zu diesem Zweck wurden folgende Pflanzen nach der vorher beschriebenen Methode extrahiert: *Xanthosoma maximiliani*, *Pelargonium zonale* „Wilhelm Langgut", *Dracaena fragrans* var. *Lindenii*, *Chlorophytum Sternbergianum*. Andererseits mußten Pflanzenteile geprüft werden, die normalerweise nie Chlorophyll bilden, um zu entscheiden, ob tatsächlich ein Zusammenhang mit der Ausbildung der grünen Pigmente besteht. Hierzu wurden Wurzeln von *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* (Dikotylen!) und *Zea mays* (Monokotyle!) aufgearbeitet. Die Pflanzen waren im Dunkeln, in feuchtem Sand-Sägemehlgemisch aufgezogen worden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von TODD und GALSTON legen sie die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Pigment um einen Stoff handelt, der nur in Pflanzengewebe gebildet werden kann, das ursprünglich die Fähigkeit zur Chlorophyllbildung besaß, einerlei, ob sie nun durch einen natürlichen Einfluß (Plastidenmutation wie bei *Tradescantia*) oder einen künstlichen Eingriff (Verhinderung der Chlorophyllbildung durch Dunkelheit, z. B. bei den Extrakten aus etiolierten Erbsenepikotylen nach den Versuchen von TODD und GALSTON) gehemmt wurde.

e) Prüfung auf wasserlösliche Pigmente. Versuche zum Nachweis wasserlöslicher Pigmente mit charakteristischen Absorptionsbanden im Bereich des sichtbaren Lichts verliefen erfolglos.

Zusammenfassend kann über die Ergebnisse der vergleichenden Pigmentbestimmung bei chlorophylldefekten und normalen Pflanzen gesagt werden, daß eine große Ähnlichkeit in den qualitativen Verhältnissen besteht. Wenn jedoch die quantitativen Verhältnisse betrachtet werden, so fällt auf, daß die Chlorophylle in den Albinopflanzen in außerordentlich geringen Mengen vorkommen. Das Verhältnis:

$$\frac{\text{Gesamtchlorophyll (Albinopflanze)}}{\text{Gesamtchlorophyll (Normalpflanze)}}$$

ist etwa 1:100 (Tabelle 5). Bemerkenswert ist, daß bei Albinopflanzen ein verändertes Komponentenverhältnis (a/b) auftritt. Es beträgt 1,56. Mit diesem Befund läßt sich gut die Annahme vereinbaren, daß Chlorophyll b wesentlich stabiler ist, wenn ein Plastidendefekt auftritt (SEY-

BOLD und EGLE 1938). Bei den Normalpflanzen stimmt das Verhältnis a/b gut mit den bei anderen höheren Pflanzen gefundenen Verhältnissen überein, es beträgt 2,2 (Tabelle 5). Bei dem albicaten Gewebe ist also eine sehr tiefgreifende Störung der Chlorophyllbildung eingetreten. Sie ermöglicht es, eine Substanz zu fassen, die in einem bis jetzt noch nicht geklärten Zusammenhang mit der Biosynthese des Chlorophylls steht. Bei den Carotinoiden liegen die Dinge einfacher. In chlorophylldefekten und normalen Pflanzen konnten die gleichen Carotinoide nachgewiesen werden, der Gesamtcarotinoidgehalt von beiden steht im Verhältnis 1:10, wie aus der Tabelle 6 hervorgeht. Das Vorkommen relativ großer Mengen der gleichen Carotinoide zeigt, daß hier keine Störung der normalen Synthesekette vorliegt. Für das unterschiedliche quantitative Verhältnis wäre dann einfach die mangelnde Versorgung mit Assimilaten verantwortlich zu machen. Es ist ja bekannt, daß man bei Versuchen *in vitro* durch Glucosefütterung eine Steigerung der Carotinoidbildung erzielen kann, wie die Versuche von BEEKMANN (1953) gezeigt haben.

IV. Diskussion der Ergebnisse.

Die Untersuchung chlorophylldefekter *Tradescantien* hatte gezeigt, daß auch an Sprossen höherer Pflanzen, die über keinen funktionstüchtigen Assimilationsapparat und über keine größeren Mengen von Reservestoffen verfügen, Etiolementserscheinungen auftreten, wenn sie von dem zur Photosynthese fähigen Gewebe miternährt werden. Von voll assimilationsfähigen Pflanzen, Keimpflanzen mit Reservestoffen, und Pilzen ist das ja schon seit längerer Zeit bekannt. Wenn es auch nicht möglich war, bei dem untersuchten Objekt ein vollständiges Aktionsspektrum der formativen Wirkung zu bestimmen, so konnten doch durch Kultur unter Licht aus dem blauvioletten und rotorangen Bereich des Spektrums einige Anhaltspunkte über die Gestaltsbeeinflussung gewonnen werden. Bei nahezu intensitätsgleichem Blau- und Orangelicht verhinderte Blaulicht am wirksamsten die Überverlängerung der Internodien. Aber auch im Orangelicht konnte eine eindeutige Hemmung der Internodienstreckung beobachtet werden, wenngleich der Effekt hier nicht so stark war. In älteren Arbeiten war zunächst nur die Verhinderung der Internodienstreckung durch kurzwelliges Licht erkannt worden (TRUMPF 1924, POPP 1926, FUNKE 1931). Erst neueren Publikationen blieb es vorbehalten, auf eine ähnliche Wirkung der Strahlung aus dem langwelligen Teil des Spektrums hinzuweisen (AVERY 1938, BÜNNING 1941, WENT 1941, WITHROW 1941). Der zuletzt genannte Autor erzielte bei *Phaseolus*keimpflanzen sogar die stärkste Internodienstauchung im Rotlicht.

In den chlorophylldefekten Pflanzen konnten 5 Carotinoide, Spuren von Chlorophyll a und b, ferner ein weiteres Pigment, das vermutlich mit Methylpyrophäophorbid a identisch ist, nachgewiesen werden. Wir sehen also, daß in den Bereichen, in denen eine morphogenetische Wirkung zu erkennen war, prinzipiell die Möglichkeit zur Perzeption der wirksamen Lichtqualitäten besteht.

Wenn auch darauf hingewiesen werden muß, daß es sich beim Etiolement und seiner Verhinderung um eine ganze Reihe teils gegeneinander, teils gleichsinnig wirkender Prozesse handelt, können doch einige dieser Vorgänge genauer analysiert werden.

Wie in den eigenen Versuchen gezeigt wurde, besitzen die chlorophylldefekten Sprosse immer noch geringe Mengen von Chlorophyll a und b. Es läßt sich daher die Möglichkeit einer Beteiligung von Chlorophyllen bei der Perzeption von Lichtreizen nicht ausschließen. Andererseits besaßen die chlorophylldefekten Sprosse ein Pigment, das sehr große Ähnlichkeit mit Methylpyrophäophorbid a aufwies und ein Absorptionsmaximum im langwelligen Licht bei 668 mμ besitzt. Möglicherweise spielt diese Substanz mindestens eine zusätzliche Rolle bei der Lichtreizaufnahme von *Tradescantia*. Eine Stütze erhält diese Annahme durch die Publikation von TODD und GALSTON (1954), die gezeigt haben, daß das Absorptionsmaximum dieses Pigments weitgehend mit dem Aktionsspektrum der rotlichtgeförderten Samenkeimung, wie sie BORTHWICK und Mitarbeiter (1952) für *Lactuca* veröffentlicht haben, übereinstimmt. Das Pigment ist also prinzipiell dazu befähigt, als Sensibilisator bei der Aufnahme von Lichtreizen zu wirken. Außerdem fanden TODD und GALSTON diesen Farbstoff in etiolierten Erbsenepikotylen, deren Auxinstoffwechsel sehr stark durch Rotlicht beeinflußbar ist (GALSTON und BAKER 1953).

Wenn auch die Substanz in normal grünen Pflanzen nicht aufgefunden werden konnte, besteht trotzdem die Möglichkeit, daß das Phorbin in ganz geringen nicht faßbaren Mengen oder als Intermediärprodukt vorkommt.

Die Aktionsspektren, die für die Samenkeimung (FLINT und MCALISTER 1937), den Photoperiodismus (PARKER und Mitarbeiter 1946, 1949, 1950) und die formative Wirkung (PARKER und Mitarbeiter 1949, WASSINK und Mitarbeiter 1951) gefunden wurden, zeigen wohl große Ähnlichkeit, jedoch bemerkenswerterweise keine Gleichheit. Aus dieser Tatsache könnte gefolgert werden, daß eine Reihe von Farbstoffen mit gleichem chemischen Grundgerüst aus der Gruppe der Phorbine der a-Reihe, zu denen ja auch das Chlorophyll a und das Methylpyrophäophorbid a gehört, in ähnlicher Weise als Sensibilisatoren wirksam sein

können. Diese Pigmente unterscheiden sich ja auch sehr wenig in den Maxima ihrer Absorptionsspektren (FISCHER und ORTH 1940).

Daß für die Lichtabsorption im kurzwelligen Bereich ebenfalls Chlorophylle oder verwandte Farbstoffe in Frage kommen, ist unwahrscheinlich. Die Chlorophylle und das methylpyrophäophorbidähnliche Pigment besitzen wohl Absorptionsmaxima zwischen 400 und 500 mμ. Die vorliegenden Versuche zeigten ja, daß das kurzwellige Licht stark wirksam ist. Da aber reichlich Carotinoide vorhanden sind und nur ganz geringe Mengen von Chlorophyllen und dem anderen Tetrapyrrol, ist damit zu rechnen, daß die gelben Pigmente entscheidend sind für die Lichtabsorption.

Andere Befunde, z. B. das Hauptmaximum der Photosynthese im Rotlicht, sprechen dafür, daß die Absorptionsmaxima der Chlorophylle nicht ausgenutzt werden können. Das legt natürlich die Vermutung nahe, daß die Carotinoide einen großen Teil des einfallenden Lichts wegfiltern. Eine endgültige Entscheidung dieser Frage wäre allerdings erst möglich, wenn geklärt ist, wie die Carotinoide und Chlorophylle in den Plastiden zueinander angeordnet sind.

Weiterhin muß bei der Wirkung auf die Internodien mit einer Beeinflussung der Zellteilung gerechnet werden. Nach Versuchsbeginn konnte an den Pflanzen, die bei reduziertem Tageslicht gehalten wurden, ein Wiederaufleben der Zellteilung in der meristematischen Zone an der Internodienbasis beobachtet werden. Diese Wirkung konnte zwar nicht quantitativ verfolgt werden, jedoch war unter den Filtern dieser Effekt nur gering. An einem einfacheren Objekt, wie es das *Avena*-Mesokotyl darstellt, konnten WEINTRAUB und PRICE (1947) zeigen, daß die Zellteilung eine maßgebliche Rolle bei der formativen Lichtwirkung spielen kann.

Die Wirkungen der verschiedenen Lichtbedingungen auf das Blattwachstum sind nicht eindeutig genug, um einer weiteren Analyse zugänglich zu sein. Grundsätzlich muß aber hier mit ähnlichen Vorgängen gerechnet werden wie bei der Beeinflussung des Internodienwachstums, denn bei der Verhinderung der an den Blättern untersuchten Etiolementserscheinungen erwiesen sich die gleichen Lichtqualitäten als wirksam. Dieser Befund läßt sich mit den Ergebnissen WENTS (1941) und STOLWIJKS (1952) in Einklang bringen. Sie hatten bei etiolierten Erbsenkeimlingen gefunden, daß rotgelbes Licht das Blattwachstum am stärksten fördert. Auch Blauviolett war wirksam, jedoch weniger stark. Die quantitativ in gleicher Größenordnung liegenden Wirkungen von Blau- und Orangelicht in den eigenen Versuchen, wie sie bei der Untersuchung der Blattdicke auftraten, wären dann ein Hinweis dafür, daß das Verhältnis der Einzelkomponenten, die bei der Untersuchung der

Internodien genauer zu fassen sind, etwas verschoben ist. Jedenfalls zeigen die Versuche zur Blattdifferenzierung, obwohl sie nur orientierenden Wert besitzen können, daß sowohl kurzwelliges als auch langwelliges Licht formativ wirksam sein kann, wenn auch noch kein tieferes Eindringen in die sicher sehr komplizierten Vorgänge möglich ist, die bei der Blattdifferenzierung zusammenwirken.

Zusammenfassung.

1. Die vergleichende Untersuchung chlorophylldefekter und normaler Sprosse von *Tradescantia albiflora* var. *albovittata* hat ergeben, daß bei verringerter Lichtintensität bei beiden Etiolementserscheinungen auftreten. Die Internodien erfahren eine Überverlängerung, die Blattdicke nimmt ab und das Spreitenwachstum der Blätter wird gehemmt.

2. Die Versuche zur Beeinflussung der untersuchten Etiolementserscheinungen haben gezeigt, daß Blaulicht am wirksamsten die übermäßige Internodienstreckung verhindert. Auch Orangelicht war wirksam, jedoch nicht so stark wie Blaulicht.

3. Die Blattdifferenzierung konnte ebenfalls durch Licht dieser beiden Bereiche des Spektrums günstig beeinflußt werden. Die Ergebnisse sind jedoch nicht klar genug, um Deutungen zu ermöglichen.

4. Bei chlorophylldefekten und normalen Sprossen liegt ein qualitativ sehr ähnlicher Pigmentbestand vor. In chlorophylldefektem Material wurden die fünf gleichen Carotinoide wie in Normalpflanzen nachgewiesen. Es kommen vor: β-Carotin, α-Carotin, Lutein, Taraxanthin und ein nicht näher bestimmbares Carotinoid. Das Verhältnis der Gesamtcarotinoide in chlorophylldefekten und Normalpflanzen betrug etwa 1:10. Chlorophylldefekte Blätter besaßen ganz geringe Mengen von Chlorophyll a und b. Im Vergleich zu normalen Pflanzen verhielten sich die Gesamtchlorophyllmengen wie etwa 1:100.

5. Bei Albinopflanzen trat ein verändertes Komponentenverhältnis a/b auf. Es war etwa 1,56, während es bei normalen Pflanzen 2,2 war.

6. In albicatem Gewebe konnte ein weiteres Pigment nachgewiesen werden. Es besaß Absorptionsmaxima bei 410 · 505 · 535 · 610 · 668 mμ (in Äther photometriert!). Es gehört zur Gruppe der Phorbine und ist wahrscheinlich mit Methylpyrophäophorbid a identisch. Chlorophylldefekte Sprosse besitzen also Pigmente mit Absorptionsmaxima in den Spektralbereichen, in denen sich eine morphogenetische Wirkung beobachten läßt.

7. Bei der Untersuchung weiterer chlorophylldefekter Pflanzen konnte in *Xanthosoma maximiliani* ebenfalls das gleiche Phorbinpigment aufgefunden werden. Extrakte aus Wurzeln von *Pisum sativum*,

Phaseolus vulgaris und *Zea mays* zeigten keine Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des Lichts. Es kann also angenommen werden, daß der Farbstoff in einem Zusammenhang mit der Biosynthese des Chlorophylls steht.

8. Versuche zur Extraktion von Pigmenten, die wasserlöslich sind und im sichtbaren Bereich des Spektrums absorbieren, verliefen ohne Erfolg.

Herrn Prof. Dr. E. Bünning danke ich für die Anregung zu dieser Untersuchung und ihre ständige Förderung. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte Geräte zur Verfügung. Hierfür soll ebenfalls an dieser Stelle gedankt werden.

Literatur.

Avery, G. S.: Growth and cell structure in the first internode and coleoptile of Avena as affected by red, green and blue radiation. Amer. J. Bot. **25**, 105 (1938). — Beekmann, H.: Untersuchungen über den Umsatz von Carotinoiden in höheren Pflanzen. Z. Bot. **42**, 387 (1954). — Bernstein, L., and I. F. Thompson: Studies on the carotene-destroying processes in drying bean leaves. Bot. Gaz. **109**, 204 (1947). — Borthwick, H. W., S. B. Hendricks, M. W. Parker, E. H. Toole and V. K. Toole: A reversible photoreaction controlling seed-germination. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **38**, 662 (1952). — Bünning, E.: Über die Verhinderung des Etiolements. Ber. dtsch. bot. Ges. **59**, 2 (1941). — Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanzen, 3. Aufl. Berlin: Springer 1953. — Comar, C. L., and F. P. Zscheile: Analysis of plant extracts for chlorophylls a and b by a photospectrometric method. Plant Phys. **17**, 198 (1942). — Douin, R.: Analyse chromatographique sur papier des pigments chlorophylliens. Rev. gén. Bot. **60**, 777 (1953). — Fischer, H., u. H. Orth: Die Chemie des Pyrrols, Bd. II, 2. Hälfte, bearb. v. H. Fischer u. A. Stern. Leipzig 1940. — Flint, L. H., and E. D. McAlister: Wave-length of radiation in the visible spectrum promoting the germination of light-sensitive lettuce seed. Smiths. Misc. Coll. **96** (1937). — Funke, G. L.: On the influence of light of different wave-length on the growth of plants. Rec. Trav. bot. néerl. **28**, 451 (1931). — Galston, A. W., and R. Baker: Studies on the physiology of light action. V. Photoinductive alteration of auxin metabolism in etiolated peas. Amer. J. Bot. **40**, 512 (1953). — Goodwin, T. W.: The comparative biochemistry of the carotinoids. London: Chapman a. Hall 1952. — Carotinoids. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Bd. III. Herausgeg. von K. Paech u. M. V. Tracey. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954. — Granick, S.: Protoporphyrin 9 as a precursor of chlorophyll. J. of biol. Chem. **172**, 717 (1948). — Magnesium vinyl-pheoporphyrin a_5, another intermediate in the biological synthesis of chlorophyll. J. of biol. Chem. **183**, 713 (1950) — Karrer, P., u. E. Jucker: Carotinoide. Basel: Birkhäuser 1948. — Moster, J. B., Quackenbusch and I. W. Porter: The carotinoids of corn seedlings. Arch. of Biochem. **38**, 287 (1952). — Parker, M. W., S. B. Hendricks and H. W. Borthwick: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of the long-day-plant Hyoscyamus niger. Bot. Gaz. **111**, 242 (1950). — Parker, M. W., S. B. Hendricks, H. W. Borthwick and N. J. Scully: Action spectrum for the photoperiodic control of floral initiation of short-day plants. Bot. Gaz. **108**, 1 (1946). — Parker, M. W., S. B. Hendricks, H. W. Borthwick and F. W. Went: Spectral sensitivities for leaf and stem growth of etiolated pea seedlings

and their similarity to action spectra for photoperiodism. Amer. J. Bot. **36**, 194 (1949). — POPP, H. W.: A physiological study of the effect of light of various ranges of wavelength on the growth of plants. Amer. J. Bot. **13**, 706 (1926). — RUGE, U.: Über die Bedeutung des Chlorophylls für die Entwicklung der Adventivwurzeln. Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 338 (1952). — SCHANZ, FR.: Wirkungen des Lichts verschiedener Wellenlängen auf die Pflanze. Ber. dtsch. bot. Ges. **37**, 430 (1919). — SEYBOLD, A., u. K. EGLE: Lichtfeld und Blattfarbstoffe. II. Planta (Berl.) **28**, 87 (1938). — Zur chromatographischen Methode der Blattpigmente. Planta (Berl.) **29**, 114 (1939). — STOLWIJK, I. A. I.: Photoperiodic and formative effects of various wave-length regions in Cosmos bipinnatus, Spinacia oleracea, Sinapis alba and Pisum sativum. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Sér. C **55**, 489 (1952). — TODD, G. W., and A. W. GALSTON: A porphyrin pigment from photosensitive non chlorophyllous plant tissues. Plant. Physiol. **29**, 311 (1954). — TRUMPF, CH.: Über den Einfluß intermittierender Belichtung auf das Etiolement der Pflanzen. Bot. Archiv. **5**, 381 (1924). — WASSINK, E. C., I. A. I. STOLWIJK and A. B. R. BEEMSTER: Dependance of formative and photoperiodic reactions in Brassica rapa var., Cosmos and Lactuca on wave-length and time of irradiation. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Sér. C **54**, 421 (1951). — WEINTRAUB, R., and L. PRICE: Developmental physiology of the grass seedling. II. Inhibition of mesocotyl elongation in various grasses by red and violett light. Smiths. Misc. Coll. **106**, 1 (1947). — WENT, F. W.: Effect of light on growth. Amer. J. Bot. **28**, 83 (1941). — WILLSTÄTTER, R., u. A. STOLL: Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin: Springer 1913. — WITHROW, R. B.: Responses of seedlings to various wave-bands of low intensity irradiation. Plant Physiol. **16**, 241 (1941).

KLAUS DRUMM, Tübingen, Bot. Inst. der Universität.

Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Namen von Zwillingsautoren werden im Text der Verdeutlichung wegen durch „u." statt durch „und" verbunden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Soeben erschien:

Anleitung zur organischen qualitativen Analyse

Von Dr. **Hermann Staudinger**, o. ö. Professor der Chemie, Direktor des Staatlichen Forschungsinstitutes für makromolekulare Chemie in Freiburg i. Br. Sechste Auflage. Unter Mitarbeit von Dr. **Werner Kern**, o. ö. Professor für organische Chemie und Direktor des organisch-chemischen Institutes der Universität Mainz.

XII, 168 Seiten 8°. 1955. Steif geheftet DM 12.60

Aus dem Vorwort zur sechsten Auflage: Im Vorwort zur ersten Auflage wurde auf die Notwendigkeit hingewiesen, die qualitative organische Analyse in den praktischen Unterricht der organischen Chemie einzuführen, da der Studierende bei der Durchführung derartiger Analysen einen besseren Überblick über die wichtigsten Reaktionen der organischen Chemie erhält als bei der früher ausschließlich üblichen Ausbildung durch präparative Arbeiten.

Auf diese Gedankengänge braucht heute nicht mehr eingegangen zu werden, nachdem die organische Analyse, wie das Erscheinen einer sechsten Auflage zeigt, in zahlreichen Laboratorien eingeführt ist, und nachdem auch im Ausland dieser Analysengang Eingang gefunden hat, wie aus den Übersetzungen des vorliegenden Buches ins Englische, Französische, Japanische und Spanische hervorgeht. Nachdem die zweite Auflage gegenüber der ersten vor allem durch Einführung der Tabellen am Schluß des Buches durch Herrn Dr. W. Frost eine wesentliche Erweiterung erfahren hat, wurden in den weiteren Auflagen keine prinzipiellen Änderungen mehr vorgenommen. Es wurden aber an zahlreichen Stellen Verbesserungen eingeführt und neue Methoden berücksichtigt, so in der vorliegenden Auflage die chromatographischen Methoden.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie

Von Professor Dr. **Alfred Kühn,** Tübingen. Mit 477 Abbildungen. IX, 506 Seiten Gr.-8°. 1955. Ganzleinen DM 43.60

Aus den Besprechungen: *A. Kühn*, der ebensosehr mit den Problemen der Genetik wie mit den Grundfragen und Methoden der Entwicklungsphysiologie vertraut ist, geht überall aus von der erbbedingten Reaktionsnorm der Entwicklungssysteme, um dann zu zeigen, wie innere und äußere Faktoren die Ontogenese leiten und wie dabei die Form und Funktionsstruktur des Organismus entsteht. Nirgends wird eine scharfe kausalanalytische Fragestellung verlassen, und Hypothesen, denen kein heuristischer Wert zukommt, finden keine Beachtung. Die Behandlung der Probleme wird andererseits überall bis an die Front der heutigen Forschung herangeführt. Auf ungelöste Probleme und fundamentale Erkenntnislücken wird ausdrücklich hingewiesen.

Der Aufbau des Werkes ist ausgesprochen thematisch. Im Zentrum einer jeden Vorlesung stehen die allgemeinen Probleme; was zu ihrer Lösung herangezogen werden kann, wird benützt, gleichgültig, aus welcher Tier- oder Pflanzengruppe das Experimentalbeispiel oder das erklärende Modell stammt. Erfreulicherweise kommen auch viele, teilweise vergessene Arbeiten aus der klassischen Frühzeit der experimentierenden Entwicklungsforschung zu neuer Geltung. Die sprachliche Gestaltung bleibt einfach und ist von vorbildlicher Präzision. Die überaus zahlreichen Bilder genügen höchsten Ansprüchen. *Alfred Kühn* ließ alle Abbildungen der Originalliteratur nach einheitlichem Stil umzeichnen. So mußte ein wirklich „schönes" Buch entstehen.

Zum Kernstück des Buches werden die Vorlesungen über die Entwicklungsphysiologie der Echinodermen, Amphibien und Insekten. Hier findet der Leser eine ausführlich dokumentierte Darstellung der Determinationsprobleme, der Gefällesysteme, der Induktionsvorgänge und der embryonalen Topogenese. Diesen Regulationstypen stellt der Verfasser die Mosaikentwicklung gegenüber, wie sie bei Asciden und bei Wirbellosen mit Spiralfurchung verwirklicht ist. Meisterhaft erläutert wird die besonders in neuester Zeit erfolgreich fortschreitende Entwicklungsphysiologie der Insekten. Dabei kommen auch die hormonalen Vorgänge, die in der Metamorphose wirksam sind, zur Darstellung.

Daß der Verfasser als Zoologe es unternimmt, die nicht einfachen Probleme der Entwicklungsphysiologie pflanzlicher Systeme zu erläutern, darf als ungewöhnliches Verdienst gelten. Die Unterschiede zu den Grundlagen und Vorgängen, die für zoologische Objekte charakteristisch sind, treten in dieser umfassenden Übersicht besonders klar hervor.

In den letzten Vorlesungen spricht der Genetiker *A. Kühn* zu uns. Er zeigt, wie die Einzelfaktoren des Erbgefüges in die Entwicklung eingreifen, welche Mittel zur Merkmalsbildung eingesetzt werden und auf welchen Wegen die merkmalsreichen Phänotypen zustande kommen.

Akademische Lehrer, Forscher und Studierende werden das prächtige Buch willkommen heißen, und dem Autor für eine Arbeit danken, die nur er so erfolgreich bewältigen konnte. „Die Naturwissenschaften"

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei.

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany.